

Anna Kärkkäinen

# Ennenaikaiseen synnytykseen ja kohdunsisäiseen infektiin liittyvien merkkiaineiden määrittäminen potilasnäytteistä

Opinnäytetyö

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Terveys ja hoitaminen

Bioanalyttikko

Opinnäytetyö

13.4.2015

Pikkuiselle "Piimälle",  
jonka syntymä konkretisoi  
työn todellisen merkityksen

Tekijä Otsikko  Sivumäärä Aika	Anna Kärkkäinen Ennenaikaiseen synnytykseen ja kohdunsisäiseen infekioon liittyvien merkkiaineiden määrittäminen potilasnäytteistä  36 sivua + 2 liitettä 13.4.2015
Tutkinto	Bioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	Bioanalytiikan koulutusohjelma
Ohjaajat	Tutkimus ja tuotekehityspäällikkö Juuso Juhila Lehtori Hannele Pihlaja
<p>Ennenaikainen synnytys on yksi äitiyshuollon suurimpia ongelmia ja aina riski syntyvälle lapselle. Suurin yksittäinen tunnettu syy ennenaikaiselle synnytykselle on kohdunsisäinen infektio. Kohdunsisäisen infektion kliininen diagnosointi on vaikeaa ja löytää vain pienen osan potilaista. Lapsiveden korkea LD ja matala sokeri ennustavat tulehdusta, mutta tavoitteena on löytää uusia vielä herkempiä ja tarkempia merkkiaineita.</p> <p>Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli määrittää potilasnäytteistä proteiineja, joita voitaisiin mahdollisesti tulevaisuudessa käyttää biologisina merkkiaineina kehiteltäessä uusia menetelmiä ennenaikaisen synnytyksen ennustamiseen ja mahdollisen kohdunsisäisen infektion diagnosointiin. Samalla vertailtiin käytettyjen menetelmien soveltuvuutta merkkiaineiden pitoisuusmäärittäykseen. Työ on osa suurempaa tutkimusohjelmaa (SalWe: "Get It Done"), jossa Medix Biochemica on mukana. Projekti jatkuu opinnäytetyön valmistumisen jälkeen.</p> <p>Työn lähtökohtana käytettiin RayBio® Biotin Label-based Human Antibody Array 1-sovelluksella tehtyä analyysiä, jossa emättimen kautta otetuista eritenäytteistä oli määritetty 507 proteiinin ilmenemistasot. Tulosten analysoinnin perusteella valittiin tarkempaan tutkimukseen kaksikymmentä proteiinia, joiden ilmentymistä tutkittiin Magnetic Luminex® Screening Assay-menetelmällä valikoiduista lapsivesinäytteistä. Tämän lisäksi osa proteiineista testattiin ELISA-testeillä suuremmalla näytemäärällä.</p> <p>Tulosten perusteella voitiin tiettyjen merkkiaineiden pitoisuuksissa nähdä tilastollisesti merkittäviä eroja tutkimus- ja verrokinäytteiden välillä kaikilla käytetyillä menetelmillä. Proteiinimikroarraytulosten avulla päästiin myös bioinformatiivisiin menetelmin tarkastelemaan ennenaikaisen synnytyksen syihin mahdollisesti liittyviä biologisia mekanismeja. Ennenaikaisesti synnyttäneiden potilaiden näytteissä voitiin havaita tulehduksellisten tapahtumien ja niihin liittyvien proteiinien lisääntymistä raskauden edetessä suhteessa täysiaikaisesti synnyttäneiden verrokkiryhmään.</p> <p>Tässä opinnäytetyössä tarkempaan analysointiin valituista merkkiaineista MMP-9 ja IL-6 erottelivat tutkimus- ja verrokinäytteet toisistaan parhaiten sekä Magnetic Luminex® Screening Assayn että ELISA-määritysten perusteella. CRP- ja IGFBP-1-pitoisuuksissa nähtävät erot eivät tässä tutkimuksessa määritetyissä lapsivesinäytteissä olleet yhtä selkeitä. Tulosten perusteella voidaan jatkotutkimuksiin valita lupaavia merkkiaineita, jotka saattaisivat mahdollisesti tulevaisuudessa olla käyttökelpoisia ennenaikaisen synnytyksen ennakoointiin ja kohdunsisäisen infektion diagnosointiin.</p>	
Avainsanat	kohdunsisäinen infektio, biologinen merkkiaine, ELISA, ennenaikainen synnytys, lapsivesi, multiplex-ELISA, proteiinimikroarray

Author Title	Anna Kärkkäinen Determination of Biomarkers Related to Preterm Birth and Intra-amniotic Infection from Vaginal and Amniotic Fluid Samples
Number of Pages Date	36 pages + 2 appendices 13 April 2015
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Program	Biomedical Laboratory Science
Specialization	Biomedical Laboratory Science
Instructors	Juuso Juhila, R&D Manager Hannele Pihlaja, Senior Lecturer
<p>Preterm birth is a major challenge in maternity care and always a risk to the baby. The most common cause of a preterm birth is an intra-amniotic infection. Clinical diagnosis of IAI is complicated and reveals only a small portion of the patients. The purpose of our study was to determine novel biomarkers which could be used to design future methods to predict preterm birth and to diagnose intra-amniotic infection. The biomarkers were determined from vaginal and amniotic fluid samples. Our study was carried out at Medix Biochemica as part of a research program (SalWe: "Get it Done") which will continue in the future.</p> <p>The starting point of our study was to analyze the results from RayBio® Biotin Label-based Human Antibody Array 1 which was performed earlier in the R&amp;D project with vaginal swap samples. Based on these results, we selected 20 biomarkers to Magnetic Luminex® Screening Assay. Some of the biomarkers were further tested with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Magnetic Luminex® Screening Assay and ELISA test were performed by using amniotic fluid samples.</p> <p>The results of our study showed different expression patterns of selected biomarkers between the case and control samples. The differences were seen with all selected methods. The protein microarray dataset possess bioinformatic pathway analysis that gave us information about possible biological mechanisms behind the preterm birth. Results of the pathway analysis indicate increasing activity in inflammatory processes and expression levels of inflammatory-associated proteins were higher in patient samples with the preterm birth.</p> <p>Based on the results of Magnetic Luminex® Screening Assay and ELISA tests, the most suitable biomarkers to separate the sample groups were MMP-9 and IL-6. The differences seen with CRP and IGFBP-1 concentrations in amniotic fluid samples were not that distinct. Based on our study the promising biomarkers can be selected for the further study and could possibly be used for designing future methods to predict preterm birth and to diagnose intra-amniotic infection.</p>	
Keywords	amniotic fluid, biomarker, ELISA, intra-amniotic infection, multiplex ELISA, preterm birth, protein microarray

## Sisällys

1	Johdanto	1
2	Enneaikainen synnytys ja kohdunsisäinen infektio	2
2.1	Raskauden normaali kulku ja täysiaikainen synnytys	2
2.2	Enneaikainen synnytys	3
2.3	Kohdunsisäinen infektio	6
2.4	Biologiset merkkiaineet enneaikaisen synnytyksen ennakkoinnissa ja kohdunsisäisen infektion toteamisessa	8
2.4.1	Insuliinin kaltaisen kasvutekijän sitojaproteiini 1 (IGFBP-1)	9
2.4.2	Matriksimetalloproteiinaasit (MMP:t)	9
2.4.3	Valkosolujen elastaasi	10
2.4.4	Interleukiini-6 (IL-6)	11
2.4.5	C-reaktiivinen proteiini (CRP)	12
3	Immunokemialliset määrittämenetelmät	12
4	Opinnäytetyön toteutus	14
4.1	Näytteet	15
4.2	Työvaiheet ja käytettävät menetelmät	16
4.2.1	RayBio® Biotin Label-based Human Antibody Array 1	16
4.2.2	Magnetic Luminex® Screening Assay	17
4.2.3	ELISA-testit	18
5	Tulokset	19
5.1	RayBio® Biotin Label-based Human Antibody Array 1	19
5.2	Magnetic Luminex® Screening Assay	21
5.3	ELISA	23
5.4	Magnetic Luminex® Screening Assayn ja ELISA-testien vertailu	25
6	Pohdinta	27
6.1	Eettiset kysymykset	27
6.2	Tulosten tarkastelu, luotettavuus ja johtopäätökset	28
6.2.1	RayBio® Biotin Label-based Human Antibody Array 1	28
6.2.2	Magnetic Luminex® Screening Assay ja ELISA-määrittäykset	29
6.3	Tulosten hyödyntäminen, tulevaisuus ja jatkotutkimusmahdollisuudet	30
	Lähteet	31

## Liitteet

- Liite 1. Näyteryhmät RayBio® Biotin Label-based Human Antibody Array 1 määrittäksessä (Medix Biochemica)
- Liite 2. RayBio® Biotin Label-based Human Antibody List (RayBiotech, Inc 2009.)

## 1 Johdanto

Ennenaikaisella synnytyksellä tarkoitetaan vähintään kolme viikkoa ennen laskettua aikaa tapahtuvaa synnytystä. Se on maailmanlaajuinen ongelma ja aina riski syntyvälle lapselle. Suurin yksittäinen syy ennenaikaisille synnytyksille on kohdunsisäinen infektio, joka pahimmillaan voi aiheuttaa sikiön menehtymisen kohtuun vakavan hapenpuutteen seurauksena. (Ennenaikainen synnytys 2011.) Kohdunsisäisen infektion ainoa tehokas hoito on synnytyksen käynnistäminen, mutta etenkin erittäin ennen aikaisten keskosten kohdalla raskauden keston vähäinenkin pidentyminen vaikuttaa oleellisesti syntyvän lapsen ennusteeseen. Infektion uhatessa sikiötä onkin ensiarvoisen tärkeää saada diagnoosi luotettavasti, jotta voidaan tehdä tilanteeseen sopiva, eettisesti vaikea hoitopäätös. (Ennenaikainen synnytys 2011; Saarikoski 2011: 396.)

Opinnäytetyöni tarkoituksena oli kvantitatiivisin immunokemiallisin menetelmin kartoittaa ja testata proteiineja, joiden esiintymisen ja pitoisuuksien perusteella voitaisiin mahdollisesti tunnistaa ennen aikaisen synnytyksen riski sekä mahdollinen kohdunsisäinen infektio. Tutkittavat näytemateriaalit olivat punktoituja lapsivesiä sekä emätineritenäytteitä. Tutkimuksessa toivottiin saatavan ennen aikaisen synnytyksen ja kohdunsisäisen infektion syntymekanismeista sekä niihin liittyvistä biologisista merkkiaineista tietoa, jota voitaisiin hyödyntää uusien diagnosointimenetelmien kehittämisessä. Samalla vertailtiin käytettyjen menetelmien soveltuvuutta merkkiaineiden määrittämiseen projektin jatkoa ajatellen.

Työtä ohjasivat seuraavat tutkimuskysymykset:

1. Nähdäänkö proteiinien ilmentymisessä eroja tutkimus- ja verrokinäytteiden välillä?
2. Soveltuvatko käytetyt määritysmenetelmät merkkiaineiden määrittämiseen jatkossa?

Työn toimeksiantaja, Medix Biochemica, on monoklonaalisten vasta-aineiden ja terveydenhuollon käyttöön suunnattujen pikatestien kehittämiseen, tuottamiseen ja markkinointiin keskittynyt suomalainen yritys. (Yritysprofiili. Medix Biochemica). Yrityksen tuotevalikoimaan kuuluvista pikatesteistä kaksi on kehitetty raskausajan komplikaatioiden tunnistamiseen: Actim PROM sikiökalvojen ennen aikaisen puhkeamisen toteamiseen ja Actim Partus uhkaavan ennen aikaisen synnytyksen riskin arviointiin. (Actim-

tuotteet. Medix Biochemica.). Opinnäytetyö tehtiin osana laajempaa ja pidempikestoista tutkimusohjelmaa (SalWe: "Get it Done"), jossa Medix Biochemica on mukana.

## 2 Ennenaikainen synnytys ja kohdunsisäinen infektio

Ennen raskausviikkoa 37+0 syntyy Suomessa vuosittain hieman alle 6 prosenttia elävänä syntyneistä vauvoista, mikä vuonna 2013 tarkoitti noin 3 355 vauvaa. Ennenaikaisina syntyneistä lapsista noin 1 prosentti painaa syntyessään alle 1500 grammaa ja noin 0,5 prosenttia alle 1000 grammaa. (Mikkola – Tommiska – Hovi – Kajantie 2009; Stefanovic 2015: 459.) Vastasyntyneiden tehohoidon kehittymisen ja keskittämisen ansiosta yhä pienemmät keskoset selviävät ennenaikaisuudestaan huolimatta (Korvenranta ym. 2010; Rahkonen 2010: 13). Pikkukeskosten alkuhoito ja ennenaikaisuudesta mahdollisesti aiheutuvat pitkäaikaissairaudet, kuten CP-vamma ja epilepsia, aiheuttavat kuitenkin suuria kustannuksia ensimmäisten elinvuosien aikana. Suhteessa täysiaikaiseen vertailuryhmään erittäin ennenaikaisten keskosten hoidon kustannukset ensimmäisten 5 elinvuoden aikana ovat 1,4–4,4-kertaiset. (Korvenranta ym. 2010.) Koska ennenaikaisista synnytyksistä jopa yli kolmannes aiheutuu kohdunsisäisistä infektioista (Ennenaikainen synnytys 2011), on luotettavien diagnoosimenetelmien kehittäminen merkittävää sekä elämänlaatuun vaikuttavien että taloudellisten tekijöiden vuoksi.

### 2.1 Raskauden normaali kulku ja täysiaikainen synnytys

Raskauden normaali kesto on noin 280 vuorokautta eli 40 viikkoa. Raskauden kesto merkitään tavallisesti täysinä viikkoina ja päivinä, kuten 30+2. Merkintä tarkoittaa raskauden kestäneen 30 viikkoa ja kaksi päivää, ja että meneillään on 31. raskausviikko. (Sariola – Tikkanen 2011: 308.) Raskausaika jaetaan kolmeen raskauskolmannekseen, joista jokaisella on omat erityispiirteensä. Ensimmäisellä kolmanneksella tarkoitetaan raskausviikkoja 0–13, toisella kolmanneksella raskausviikkoja 14–28 ja viimeisellä kolmanneksella raskausviikkoja 29–40. (Pietiläinen – Väyrynen 2015: 161.)

Raskauden kulkua sekä sikiön ja äidin vointia raskausaikana seurataan neuvolassa. Neuvolaseurannan tarkoituksena on paitsi valmistaa tulevia vanhempia lapsen syntymään myös tunnistaa sikiön tai äidin terveyttä mahdollisesti uhkaavat tekijät. (Eskola – Hytönen 2002: 190–192; Tiitinen 2013.) Raskauden aikana mahdollisesti ilmeneviä ongelmia voivat olla esimerkiksi raskausmyrkytys, raskausajan diabetes, ennenaikaiset supistukset tai uhkaava ennenaikainen synnytys, ennenaikainen lapsivedenmeno tai



immunisaatiot. Odottava äiti on myös tavallista alttiimpi eräille infektiosairauksille, kuten toksoplasmoosille ja listerioosille, jotka voivat uhata myös sikiön terveyttä. (Jarva – Meri 2011: 189; Nuutila 2007.)

Raskausaikana sikiö kelluu sikiökalvojen ympäröimänä lapsivedessä. Sikiökalvot ja lapsivesi suojaavat sikiötä ulkoisilta ärsykkeiltä ja infektioilta. Lapsivesi mahdollistaa sikiön symmetrisen kasvun ja edistää lihasten kehitystä, huolehtii homeostaasista ja lämmönsäätelystä sekä sisältää ravinteita ja kasvutekijöitä. Lapsiveden määrä ja koostumus vaihtelevat raskauden eri vaiheissa: alkuraskaudessa lapsivesi muodostuu äidin vesi- ja suonikalvojen läpi diffundoituvasta kudospainesta ja myöhemmin siihen suodattuu äidin plasmaa. Lapsivesi koostuu pääosin vedestä ja siinä on kudospainen ja veriplasman tapaan suoloja, aminohappoja, proteiineja, hiilihydraatteja, lipidejä sekä pigmenttejä. Lisäksi lapsiveteen hilseilee soluja sikiön iholta, virtsateistä, keuhkoista ja sikiökalvoista sekä erittyy sikiön virtsaa ja ulostetta. (Eskola – Hytönen 2002: 145–146; Litmanen 2015: 134–135.)

Täysiaikainen lapsi syntyy 38.–42. raskausviikolla. Raskauden ollessa täysiaikainen ovat sekä äiti että lapsi fyysisesti valmiita synnytykseen. Synnytyksen käynnistymisen perussy ei ole vielä täysin selvillä, mutta sekä äidin, sikiön, istukan että kohdun mekaniismien uskotaan osallistuvan synnytyksen käynnistäviin tapahtumiin. (Saarikoski 2011: 396–397; Sariola – Tikkanen 2011: 315.) Synnytys käynnistyy yleensä kohdun supistelulla, mutta 6-19 prosentissa tapauksista synnytys alkaa sikiökalvojen puhkeamisella ja lapsivedenmenolla ilman edeltäviä supistuksia. Tällöin 70 prosentissa tapauksista supistukset alkavat lapsivedenmenon jälkeen itsestään ja synnytys käynnistyy 24 tunnin kuluessa. Jos näin ei tapahdu, on täysiaikainen synnytys syytä käynnistää, sillä kalvojen puhkeamisen jälkeen on emättimen ja kohtuontelon välillä avoin väylä ja kohtutulehduksen riski kasvaa. (Sariola – Tikkanen 2011: 315, 317) Kun synnytys käynnistyy tai joudutaan käynnistämään vähintään kolme viikkoa ennen laskettua aikaa, puhutaan ennenaikaisesta synnytyksestä. (Saarikoski 2011: 396.)

## 2.2 Ennenaikainen synnytys

Kansainvälisten määritelmien mukaan synnytys on ennenaikainen, kun se tapahtuu raskausviikolla 22+0–36+6. Vastasyntyneen hoidettavuuden mukaan ennenaikaisuus voidaan jakaa ennen raskausviikkoa 28 syntyneisiin erittäin ennenaikaisiin, 28.–31.

raskausviikolla syntyneisiin kohtalaisen ennenaikaisiin sekä lievästi ennenaikaisiin, jolloin synnytys tapahtuu 32.–36. raskausviikolla (Ennenaikainen synnytys. 2011; Saarikoski 2011: 401; Stefanovic 2015: 459.)

Ennenaikainen synnytys on aina riski syntyvälle lapselle, vaikka henkiinjäämisen todennäköisyys alkaakin kasvaa jo 24. raskausviikon jälkeen. Ennen 37. raskausviikkoa syntyneiden vastasyntyneiden keuhkot sekä keskeiset elintoiminnot, kuten lämmönsäätely, verenkierto ja monet aineenvaihdunnan toiminnot, ovat vielä kypsymättömiä, ja etenkin erittäin ennenaikaisten pikkukeskosten kohdalla raskauden jatkuminen jo muutamalla päivällä parantaa huomattavasti ennustetta. (Saarikoski 2011: 396, 409–410.)

Mikäli äidin ja sikiön vointi sallivat, voidaan ennenaikaisesti käynnistynyttä synnytystä yrittää viivästyttää. Ennenaikaisia supistuksia voidaan pyrkiä hillitsemään supistustenestolääkityksellä. Myös progesteronihoitoa käytetään uhkaavan ennenaikaisen synnytyksen siirtämiseksi. Antibioottihoitoa käytetään, koska infektioiden tiedetään voivan käynnistää synnytys ennenaikaisesti ja etenkin sikiökalvojen puhjettua ennenaikaisesti on antibioottihoito tarpeen. Kohdunkaulan heikkoudesta johtuvissa tapauksissa asetettavaa tukilankaa käytetään nykyään harvoin. (Stefanovic 2015: 461, 464–468.)

Synnytyksen viivästyttäminen muutamallakin päivällä antaa aikaa sikiön valmisteleseen ennenaikaisen synnytyksen varalta. Ennen synnytystä äidille annettavalla kortikosteroideihoidolla voidaan vähentää sekä vastasyntyneen kuolleisuutta että hengitysvaikeusoireyhtymän riskiä. Magnesiumsulfaattihoidolla pyritään ehkäisemään syntyvän lapsen CP-vammaisuutta ja muita neurologisia ongelmia. (Stefanovic 2015: 464, 466–468.) Usein synnytyksen käynnistyminen ennenaikaisesti on kuitenkin merkki raskaudelle tai sikiölle haitallisesta tilasta, kuten istukan ongelmista tai sikiökalvojen tai kohdun infektiosta, joten tilannearvio on aina tehtävä huolellisesti ja tapauskohtaisesti (Stefanovic 2015: 461; Uotila – Sikkinen 2009).



Kuvio 1. Ennenaikaisena syntynyt vauva vastasyntyneiden teho-osastolla (Pöllänen, Ilona 2015).

Ennenaikaisen synnytyksen riskitekijöitä on kuvattu taulukossa 1. Vaikka ennenaikaisen synnytyksen riskitekijöitä tunnetaan paljon, jää 50 prosentissa tapauksista ennenaikaisen synnytyksen syy selvittämättä eikä kolmanneksella ennenaikaisesti synnyttävistä naisista tunnisteta yhtään riskitekijää. (Saarikoski 2011: 401–402; Stefanovic 2015: 460.) Tärkein yksittäinen tunnettu syy synnytyksen ennenaikaiseen käynnistymiseen on kuitenkin kohdunsisäinen infektio. Kohdunsisäinen infektio on todennäköinen syy etenkin hyvin varhaisessa vaiheessa käynnistyvissä ennenaikaisissa synnytyksissä. (Ennenaikainen synnytys 2011, Rahkonen 2010: 19). Raskausviikolla 24 käynnistyvissä synnytyksissä lapsivesinäytteestä tehty bakteeriviljely on positiivinen 90 prosentissa tapauksista. Tarkasteltaessa kaikkia tapauksia joissa ennenaikaiset supistukset johtavat ennenaikaiseen synnytykseen on vastaava luku 22 prosenttia. (Ekholm – Alanen 2012.)

Taulukko 1. Ennenaikaisen synnytyksen riskitekijät (mukailtu Saarikoski 2011: 402; Stefanovic 2015: 461,468)

<b>Esitietoihin liittyvät</b>	aiempi ennenaikainen synnytys tai pienipainoinen lapsi aiemmat keskiraskauden keskenmenot aiempi sikiön kuolema äidin systeemiset sairaudet, anemia, masennus, stressi konisaatio kohdun poikkeavuus
<b>Sosioekonomiset tekijät</b>	äidin ikä < 18 vuotta > 35 vuotta äidin tupakointi tai päihteiden käyttö ravitsemusongelmat alempi sosioekonominen asema yksinhuoltajuus ensi- tai monisynnyttäjäys (> 4 synnytystä)
<b>Nykyiseen raskauteen ja sikiöön liittyvät syyt</b>	monisikiöinen raskaus lapsiveden runsaus ennenaikainen vedenmeno, ennenaikaiset supistukset sikiön rakennevika, kasvuhidastuma tai makrosomia keinohedelmöitys systeemiset infektiot, bakteriovaginoosi, genitaali-infektiot, munuaisaltaan tai munuaisen tulehdukset istukan ennenaikainen irtoaminen, etinen istukka, istukkaperäiset verenvuodot raskaushepatoosi verenpaineen nousu tai pre-eklampsia

### 2.3 Kohdunsisäinen infektio

Kohdunsisäiset infektiot (intra-amniotic infection, IAI) aiheuttavat 25–40 prosenttia en-  
nenaikaisista synnytyksistä ja ovat maailmanlaajuisesti yksi suurimpia äitiyshuollon  
ongelmia (Ennenaikainen synnytys 2011; Rahkonen 2010: 19). Infektio nousee koh-  
tuun yleensä emättimestä. Sikiökalvojen ennenaikainen puhkeaminen altistaa tuleh-  
dukselle, mutta tulehduksen eteneminen lapsiveteen ja sikiöön on mahdollista myös  
kalvojen ollessa ehjät. Taudinaiheuttaja voi päästä kohtuun veriteitse istukan läpi äidin  
sepsiksen yhteydessä, vatsaontelosta munatorven kautta tai kajoavan toimenpiteen,  
esimerkiksi lapsivesipunktion, jälkeen. (Ekholm – Alanen 2012; Rahkonen 2010: 23;  
Ämmälä – Aitokallio-Tallberg 2011: 519.) Kohtuun levitessään bakteerit voivat infektoi-  
da katokalvon (desidua) ja sikiökalvojen välisen tilan, sikiökalvot (korioamnioniitti), istu-  
kan (villiitti), lapsiveden (amnioniitti), napanuoran (funisiitti) tai sikiön. (Kekki – Paavo-  
nen 2003; Rahkonen 2010: 22–24.)

Bakteeritulehduksen yhteydessä alkavat kohdun limakalvot ja sikiökalvot tuottaa tuleh-  
dusta voimistavia välittäjäaineita, kuten interleukiinit 6 ja 8 (IL-6 ja IL-8), matriksimetal-  
loproteinaaseja sekä prostaglandiineja. Samat proteiinit vaikuttavat myös synnytyksen  
käynnistymiseen liittyviin fysiologisiin tapahtumiin. Sekä äidissä että sikiössä käynnis-  
tyvän tulehdusvasteen voimakkuuteen vaikuttavat äidin ja sikiön geneettiset tekijät,  
kalvojen ja lapsiveden geneettisesti määräytyneet tulehdusta estävät ominaisuudet  
sekä kohtuun tunkeutuneen bakteerin taudinaiheuttamiskyky. Tulehdusvaste vaikuttaa  
osaltaan kliinisen kohdunsisäisen infektion kehittymiseen sekä tulehduksen mahdoli-  
sesti sikiöön aiheuttamiin vaurioihin. (Ekholm – Alanen 2012.)

Kohdunsisäinen tulehdus voi oireilla selkeästi äidin kuumeella, kohdun kivulla ja supis-  
tusherkkyydellä, äidin tai sikiön takykardialla sekä sikiön liikkumattomuudella. Myös  
limainen tai verensekainen vuoto ja sikiökalvojen puhkeaminen voivat olla merkkejä  
tulehduksesta. Arvioiden mukaan noin yhdessä prosentissa raskauksista esiintyy oireh-  
tiva infektio. (Ekholm – Alanen 2012; Ämmälä – Aitokallio-Tallberg 2011: 518–520.)  
Huomattavasti useammin IAI on kuitenkin piilevä ja todetaan mahdollisesti vasta syn-  
nytyksen jälkeen istukan, kalvojen tai napanuoran histologisista näytteistä, vaikka in-  
fektio voi alkaa jo varhaisraskaudessa (Ekholm – Alanen 2012; Rahkonen 2010). Oi-  
reettoman infektion mahdollisuus onkin syytä ottaa huomioon aina odottavan äidin ha-  
keutuessa hoitoon ennenaikaisten supistusten tai vedenmenoepäilyn vuoksi (Ekholm –  
Alanen 2012; Ämmälä – Aitokallio-Tallberg 2011: 517–519.).

Kohdunsisäisen infektion toteaminen perustuu kliinisen taudinkuvan lisäksi laboratorio-tutkimuksiin. Äidin veren CRP- ja leukosyyttipitoisuus saattavat kohota kohdunsisäisen infektion yhteydessä, mutta tulehdus voi olla myös niin paikallinen, ettei äidin elimistö siihen reagoi. Toisaalta tulehdusarvot voivat olla koholla myös muista syistä, kuten äidille sikiön kypsyttämiseksi annettavan kortisonihoidon vaikutuksesta. (Ekholm – Alanen 2012; Saarikoski 2011: 404.) CRP-määrityksen perusteella päästään kohdunsisäisen infektion kohdalla oikeille jäljille vain noin 50 prosentissa tapauksista (Saarikoski 2001: 404). Trochez-Martinez ryhmänsä kanssa toteaakin vuonna 2007 julkaistussa katsauksessa, etteivät aiemmat tutkimukset tue äidin seerumin CRP-määrityksen käyttöä IAI:n diagnosoinnissa vaan lisätutkimukset ovat tarpeen ristiriitaisten tulosten selvittämiseksi.

Äidin bakteremiasta kertova positiivinen veriviljelytulos saadaan vain noin yhdessä tapauksessa kymmenestä. Virtsa- ja emätinnäytteet on syytä tutkia virtsatieinfektion pois sulkemiseksi sekä streptokokin tai muiden emättimen bakteeritulehdusten varalta. (Ekholm – Alanen 2012.) Emättimen ja kohdunsuun infektiota voidaan tutkia eritenäytteiden biokemiallisen koostumuksen perusteella, nukleiinihappomonistuksella, antigeeniosoituksilla, viljelemällä tai natiivinäytteen mikroskopoinnilla (Paavonen 2011: 288, 290–292, 296–299; Ämmälä – Aitokallio-Tallberg 2011: 517).

Lapsiveden koostumuksen perusteella voidaan arvioida sikiön vointia ja pyrkiä tunnistamaan mahdollinen kohdunsisäinen infektiio (Stefanovic 2015: 464). Lapsivesinäyte otetaan vatsanpeitteiden läpi ohuella neulalla ultraääniohjauksessa (Eskola – Hytönen 2002: 142, 145–146). Bakteeri-infektion löytyminen viljelyssä tai nukleiinihappomonistuksessa normaalisti steriilistä lapsivesinäytteestä on aina hälyttävää. Lapsivesipunktiota ei kuitenkaan voida päivystysaikana tehdä kaikkialla ja antibioottihoito joudutaan siksi usein aloittamaan ennen näytteenottoa. Tämä aiheuttaa ongelmia etenkin viljelyiden tulosten tulkinnessa. Nukleiinihappomäärityksen tuloksiin ennen näytteenottoa aloitettu antibioottihoito ei vaikuta yhtä merkittävästi, mutta tutkimuksen käytettävyys IAI:n diagnostiikassa on vielä epäselvä. (Ekholm – Alanen 2012.)

Kohdunsisäistä tulehdusta ja ennenaikaista synnytystä ennustavia merkkiaineita on etsitty lapsivedestä jo vuosikymmeniä. Tutkimusten mukaan kohonneen laktatidehydrogenaasipitoisuuden (LD) on voitu todeta ennustavan pikaista synnytystä ja yhdistettynä matalaan glukoosipitoisuuteen viittaa kohonnut LD-pitoisuus selkeästi myös koh-

dunsisäiseen infektiin (Gerry ym. 1996; Stefanovic 2015: 464). Lapsiveden LD- ja glukoosipitoisuuksien mittaamista hyödynnetäänkin jo diagnostiikassa kohdunsisäistä infektiota epäiltäessä (Stefanovic 2015: 464). Vaikka useiden muidenkin merkkiaineiden yhteyttä ennenaikaiseen synnytykseen ja kohdunsisäiseen infektiin on tutkittu paljon, eivät ne vielä ole löytäneet paikkaansa kliinisessä käytössä. (Ekholm – Alanen 2012).

Oirehtivaa kohdunsisäistä infektiota hoidetaan suonensisäisellä antibiootilla. Koska infektio kuitenkin on vakava uhka sikiölle, on synnytys lähes aina syytä käynnistää ja vain hyvin varhaisilla raskausviikoilla voidaan raskauden jatkamista harkita tapauskohtaisesti. (Ekholm – Alanen 2012.) Kohdunsisäisen infektion varhainen diagnostiikka on edelleen vaikeaa ja epävarmaa (Saarikoski 2011: 403–404). Piilevää IAI:ta epäiltäessä klinikot joutuvat pohtimaan ennenaikaisuuden vaikutusta syntyvän lapsen ennustukseen suhteessa sikiön mahdollisesta infektoitumisesta aiheutuviin haittoihin. Tarve entistä nopeammille ja luotettavammille kohdunsisäisen infektion diagnosointimenetelmille on siis selkeä ja niihin tähtäävä tutkimus- ja kehittämistyö tärkeää.

#### 2.4 Biologiset merkkiaineet ennenaikaisen synnytyksen ennakkoinnissa ja kohdunsisäisen infektion toteamisessa

Biologisella merkkiaineella tai tunnusmerkillä, biomarkkerilla, tarkoitetaan mitattavissa olevaa tekijää tai ominaisuutta, jonka perusteella voidaan havaita biologisen tilan muutos (Tieteen termipankki 2014). Merkkiaineita, joiden perusteella voitaisiin mahdollisesti ennustaa ennen aikaista synnytystä, on tutkittu vuosikymmeniä mikä osaltaan kertoo ilmiön merkityksellisyydestä äitiyshuollossa. Tutkimukset ovat osoittaneet tiettyjen lapsiveden proteiinien pitoisuuden muutosten liittyvän ennen aikaiseen synnytykseen ja mahdolliseen kohdunsisäiseen infektiin, mutta niiden hyödyntäminen niin diagnostiikassa kuin riskiraskauksien seulonnassa on vähäistä. (Ekholm – Alanen 2012.)

Tulehdukselliset mekanismit on tutkimuksissa yhdistetty sekä täysi- että ennen aikaisen synnytyksen käynnistymiseen (Romero ym. 2006). Ei siis ole yllättävää, että monet ennen aikaiseen synnytykseen yhdistetyistä merkkiaineista liittyvät juuri immunologisiin prosesseihin. Aiemmissa tutkimuksissa on saatu viitteitä muun muassa lapsivedestä mitattujen matriksimetallproteiinaasi (MMP) -pitoisuuksien korreloinnista ennen aikaisen synnytyksen riskin ja kohdunsisäisen infektion kanssa (Harirah – Donia – Hsu 2002; Locksmith – Clark – Duff – Schultz 1999; Athayde ym. 1998). Myös sekä interle-

leukiini 6:n että valkosolujen elastaasin määrän lapsivedessä on aiemmissa julkaisuis-  
sa havaittu kasvavan kohdunsisäisen infektion yhteydessä (El-Bastawissi – Williams –  
Riley – Hitti – Krieger 2000; Harirah ym. 2002; Kidokoro – Furuhashi – Kuno – Ishikawa  
2006; Reiman ym. 2008).

#### 2.4.1 Insuliinin kaltaisen kasvutekijän sitojaproteiini 1 (IGFBP-1)

Insuliinin kaltainen kasvutekijä 1 (IGF-1) on rakenteellisesti insuliinia muistuttava aivo-  
lisäkkeen kasvuhormonieritystä säätelevä proteiini, jonka pitoisuus elimistössä kasvaa  
raskauden aikana (Koivisto 1994; Yhtyneet Medix Laboratoriot 2013). Street ym. (2006:  
567.) toteavat julkaisussaan aikaisemmin hiirillä tehtyihin tutkimuksiin viitaten IGF:n  
sääätelyjärjestelmän oikeanlaisen toiminnan olevan sikiön kasvun kannalta ratkaisevas-  
sa asemassa.

Insuliinin kaltaiselle kasvutekijälle tunnetaan kuusi sitojaproteiinia (IGFBP), joihin valta-  
osa IGF-1:stä on kiinnittyneenä. IGFBP-1 on yksi IGF-1:n sitojaproteiineista, josta käy-  
tettiin ennen nimitystä istukkaproteiini 12 (placental protein 12, PP12). (Koivisto 1994;  
Yhtyneet Medix Laboratoriot 2013.) Kurkinen-Räty (2000: 25–26) viittaa väitöskirjas-  
saan aiempiin tutkimuksiin, joiden mukaan IGFBP-1 esiintyy raskausaikana kohdun  
sisäpinnan limakalvolla, sikiön seerumissa ja äidin plasmassa. Sikiön seerumissa, äidin  
plasmassa ja lapsivedessä IGFBP-1 esiintyy pääasiassa fosforyloitumattomassa muo-  
dossaan, kun taas desiduaalissa soluissa ja maksassa sen fosforyloitunutta muotoa on  
enemmän. Fosforyloitumattoman IGFBP-1:n määrittämiseen perustuvia pikatestejä käy-  
tetäänkin äitiyshuollossa epäiltäessä lapsivedenmenoa ja sen fosforyloitunut muoto on  
ollut mielenkiinnon kohteena ennenaikaista synnytystä ennakoivia merkkiaineita etsit-  
täessä.

#### 2.4.2 Matriksimetalloproteinaasit (MMP:t)

Matriksimetalloproteinaasit (MMP:t) ovat monisoluisien eliöiden soluja yhteen liittävää,  
verkkomaisista rakenteista koostuvaa soluväliainetta, extrasellulaarista matriksia, ja  
sen erikoismuotoa, tyvikalvoa pilkkovia proteiineja (Solunetti 2006). MMP:t osallistuvat  
elimistössä moniin normaaleihin fysiologisiin tapahtumiin ja soluväliaineen luonnollisen  
tasapainon ylläpitämiseen, mutta niiden toiminnalla on havaittu olevan merkitystä myös

useissa patologisissa ilmiöissä, kuten tulehdustiloissa sekä monien syöpätyyppien synnyssä. (Pradhan-Palikhe 2011: 19.)

MMP:t ovat sinkki-ioneista riippuvaisia endopeptidaaseja, joita on ihmisestä löydetty 23 rakenteeltaan ja substraattispesifisyydeltään toisistaan poikkeavaa muotoa. MMP-perheen proteiineja erittävät useat solut, kuten neutrofiilit, makrofagit sekä endoteelisolut, ja niiden toimintaa säädellään muun muassa niitä aktivoivien valkosolujen elastaasin ja myeloperoksidaasin (MPO) sekä niille spesifisten kudosestäjien (tissuen inhibitor of metalloproteinases, TIMP) toimesta. (Pradhan-Palikhe 2001: 20, 24–25.)

Soluväliaineen uusiutuminen, fysiologinen tapahtumaketju johon MMP:t soluväliaineen hajottajina osallistuvat, liittyy vahvasti synnytystä edeltäviin tapahtumiin, kuten kohdunsuun kypsymiseen, sikiökalvojen puhkeamiseen ja istukan irtoamiseen (Xu – Alfaidy – Challis 2002). MMP:ien ilmenemistä lapsivedessä liittyen ennenaikaiseen synnytykseen onkin tutkittu paljon jo vuosikymmenien ajan. Lapsiveden kohonneiden MMP:ien, etenkin MMP-8:n ja MMP-9:n, sekä toisaalta alentuneiden TIMP-1 pitoisuuksien yhteydestä sikiökalvojen puhkeamiseen sekä normaali- että ennenaikaisissa raskauksissa on saatu runsaasti viitteitä. (Athayde ym. 1998; Locksmith ym. 1999; Maymon ym. 2000; Maymon ym. 2001; Vadillo-Ortega ym. 1996; Xu ym. 2002.) Sekä MMP-9 että MMP-8 on lisäksi tutkimuksissa yhdistetty sekä kohonneeseen ennenaikaisen synnytyksen riskiin että kohdunsisäiseen infektiin (Harirah ym. 2002; Maymon ym. 2000; Maymon ym. 2001). MMP-8-pitoisuuden mittaamiseen perustuvia pikatestejä onkin jo testattu ennenaikaisuuden ennustamisessa ja kohdunsisäisen infektion tunnistamisessa (Kim ym. 2007; Nien ym. 2006).

#### 2.4.3 Valkosolujen elastaasi

Valkosolujen elastaasi (polymorphonuclear leukocyte elastase, PMN elastase, neutrophil elastase) on neutrofiilisten granylosyyttien erittämä endopeptidaaseihin kuuluva seriiniproteaasi. Neutrofiilit tuottavat niitä oman kehitysprosessinsa aikana ja säilövät elastaasit solulimansa jyväsiin. Valkosolujen elastaasit toimivat elimistössä solujen tulehduksen aikaiseen viestintään osallistuvina välittäjäaineina, kun tulehduspaikalle ensimmäisenä saapuvat valkosolut vapauttavat ne solulimastaan solunulkoiseen tilaan. (Pradhan-Palikhe 2011: 26–28.)



Valkosolujen elastaasit osallistuvat soluväliaineen hajottamiseen aktivoimalla matriksimetalloproteinaasien esiasteita (proMMP:t) ja toisaalta inaktivoimalla matriksimetalloproteinaasien kudosestäjä 1:ä (TIMP-1) (Pradhan-Palikhe 2011: 26–28). Kuten matriksimetalloproteinaasien, myös valkosolujen elastaasin kohonneen pitoisuuden lapsivedessä onkin tutkimuksissa havaittu liittyvän niin normaaliin kuin ennenaikaiseen synnytykseen, sikiökalvojen enneaikaiseen puhkeamiseen sekä kohtuontelon bakteerinvaaasioihin (Helmig ym. 2002; Kidokoro ym. 1996).

#### 2.4.4 Interleukiini-6 (IL-6)

Interleukiinit ovat suuri joukko solujenväliseen viestintään osallistuvia immuunijärjestelmän proteiineja, jotka poikkeavat toisistaan niin rakenteensa kuin biologisten vaikutustensa ja tehtäviensä osalta. Interleukiiniperheeseen kuuluva interleukiini-6 (IL-6) on yksi tunnetuimmista akuutin vaiheen reaktioiden välittäjäaineista ja sillä on tulehdusta voimistava vaikutus. Tulehdusreaktion käynnistyessä IL-6 yhdessä muiden proinflammatoristen sytokiinien kanssa muun muassa aktivoi B-soluja, osallistuu T-solujen erilaistumisen ja neutrofiilisten granylosyyttien kypsymisen säätelyyn sekä lisää CRP:n ja muiden akuutin faasin proteiinien tuotantoa maksassa. (Hänninen 2011: 96–97; Korhonen – Moilanen 2014; Meri – Julkunen 2011: 37, 46–49.)

IL-6 syntyy elimistössä tulehduspaikan solujen, muun muassa makrofagien ja T-lymfosyyttien, tuottamana. Sen tuotanto elimistössä käynnistyy infektion seurauksena muiden välittäjäaineiden, kuten tuumorinekroositekijän (TNF) ja interleukiini 1:n (IL-1) vaikutuksesta. IL-6:n vaikutukset elimistön puolustusjärjestelmän toiminnassa perustuvat sille spesifisen reseptorin (IL-6R) kykyyn aktivoida tulehdusgeenien ilmentymisen muutoksiin johtava solunsisäinen signaalinvälitysreitti. (Korhonen 2014.)

IL-6 on jo pitkään ollut mielenkiinnon kohteena ennenaikaisen synnytyksen ennakoimiseen ja kohdunsisäisen infektion toteamiseen liittyvissä tutkimuksissa. El-Bastawissi ym. kävivät vuonna 2000 julkaistussa katsauksessa läpi tutkimuksia vuosilta 1966 - 1999 ja totesivat lapsiveden kohonneella IL-6 pitoisuudella olevan havaittavissa vahva yhteys ennenaikaiseen synnytykseen ja esimerkiksi vuonna 2002 osoitti Harirah ryhmänsä kanssa IL-6:n korkean pitoisuuden korreloivan myös kohdunsisäisen infektion kanssa.

#### 2.4.5 C-reaktiivinen proteiini (CRP)

Tulehduksen tai vamman yhteydessä elimistön puolustusjärjestelmässä käynnistyvät niin sanotut akuutin vaiheen reaktiot. C-reaktiivinen proteiini (CRP) on yksi akuutin vaiheen tärkeimmistä proteiineista, jota muodostuu maksassa tulehdusta voimistavien välittäjäaineiden toiminnan seurauksena. Sen tuotanto lisääntyy enemmän bakteeri- kuin virusinfektion yhteydessä ja nousee tyypillisesti myös muista kudostuhoja aiheuttavista syistä, esimerkiksi sydäninfarktin yhteydessä. (Meri – Julkunen 2011: 34, 37).

Muiden ryhmänsä pentatreksiinien tavoin CRP aktivoi komplementtijärjestelmän klassista tietä sitoutumalla monien bakteerien tai sienten soluseinärakenteissa esiintyvään fosforyylikoliiniin tai solujen hajoamisen seurauksena vapautuneisiin fosfolipidi- ja kromatiinirakenteisiin. CRP:n aktivoimat komplementin proteiinit täydentävät ja voimistavat puolustusjärjestelmän reaktioita osallistumalla vieraiden rakenteiden tuhoamiseen ja poistamiseen elimistöstä. Seerumin CRP-pitoisuuden määrittystä käytetäänkin yleisesti esimerkiksi bakteeri- ja virusinfektioiden erotusdiagnostiikassa sekä mikrobilääkehoidon seurannan yhteydessä. (Meri – Julkunen 2011: 34, 37).

Varhaisraskauden aikana tapahtuvan komplementtijärjestelmän aktivoitumisen yhteydestä ennenaikaiseen synnytykseen on saatu viitteitä aiemmissa tutkimuksissa (Agrawal 2012). Lapsiveden CPR-pitoisuuden ei silti ole tutkimuksissa selkeästi todettu korreloivan ennenaikaisen synnytyksen kanssa (Tarim 2005). Vuonna 2005 havaitsi Shim ryhmänsä kanssa kuitenkin emätineritteen kohonneita CRP-pitoisuuksia sikiökalvojen enneaikaisen puhkeamisen yhteydessä.

### 3 Immunokemialliset määrittämenetelmät

Immunokemialliset määrittäykset perustuvat vasta-aineiden kykyyn sitoutua spesifisesti tunnistamiinsa vastinproteiineihinsa, antigeeneihin. Kun reaktio-olosuhteet suunnitellaan sopiviksi, suhteutuu muodostuneiden proteiinikompleksien määrä tutkittavan aineen määrään näytteessä ja menetelmiä voidaan siten käyttää kvantitatiivisiin mittauksiin. (Halonen 2004b: 90; Åkerman 2010:84.)

Vasta-aineen ja antigeenin välisessä reaktiossa muodostunut proteiinikompleksien määrä voidaan mitata näytteestä joko suoraan nefelo- tai turbidometrisesti, tai reaktioon voidaan kytkeä leima, jonka pitoisuus voidaan määrittää esimerkiksi fotometrisesti

(Åkerman 2010: 84–85). Reaktiomekanismit, joissa leimaa käytetään, voivat olla joko kilpailevaan sitoutumiseen tai kaksoisvasta-aine tekniikkaan perustuvia. Kilpailevassa sitoutumisessa tutkittavassa näytteessä oleva antigeeni kilpailee sitoutumisesta leimattun vakiomääräisen antigeenin kanssa. Kaksoisvasta-ainetekniikassa käytetään kahta vasta-ainetta, joista ensimmäinen on sidottu kiinteään alustaan, kuten kuoppalevyn pohjaan. Näytteestä tutkittava antigeeni sitoutuu vasta-aineeseen, minkä jälkeen reaktioon lisätään toinen, leimattu vasta-aine, joka sitoutuu ensimmäisessä vaiheessa muodostuneeseen proteiinikompleksiin. (Halonen 2004b: 90–91.)

Määrittämisessä käytettävän leiman perusteella immunomääritykset voidaan jakaa radioimmunomäärityksiin (RIA), fluoroimmunomäärityksiin (FIA), kemiluminesenssiimmunomäärityksiin (CLIA) sekä entsyymi-immunomäärityksiin (EIA). Entsyymi-immunomenetelmissä (enzyme immunoassay) vasta-aine tai antigeeni leimataan entsyymillä, jonka pitoisuus voidaan määrittää entsyymiaktiivisuuden perustuen entsyymin katalysoimassa reaktiossa syntyneen, esimerkiksi fotometrisesti mitattavissa olevan yhdisteen perusteella. (Halonen 2004b: 93–99; Åkerman 2010: 84–85.)

Kaksoisvasta-ainetekniikkaan perustuva entsyymiavusteinen immunomääritysmenetelmä (sandwich ELISA) on entsyymi-immunologinen määritysmenetelmä, jossa entsyymileima on kytketty vasta-aineeseen. (Halonen 2004b: 94–95; Åkerman 2010: 84.) Menetelmässä näytteestä tutkittavaan proteiiniin, antigeeniin, spesifisesti sitoutuva vasta-aine on kiinnitetty kiinteään alustaan, kuten kuoppalevyyn. Seuraavaksi reaktioon lisätään entsyymillä leimattu kaksoisvasta-aine, joka kiinnittyy aiemmin muodostuneeseen vasta-aine-antigeenikompleksiin. Viimeisessä vaiheessa leimana käytetty entsyymi hajottaa reaktioon lisättävän substraatin yhdisteeksi, jonka pitoisuus voidaan määrittää esimerkiksi värin muutoksen perusteella. Koska menetelmä on heterogeeninen, on välivaiheissa sitoutumaton aines pestävä reaktioista pois ennen seuraavaa reaktiovaihetta. (Burmester – Pezzutto 2003: 82–83; Halonen 2004b: 93–95; Savolainen 2010: 65.)

Multipleksoinnilla tarkoitetaan usean eri molekyylin tutkimista samalla kertaa yhdestä näytteestä. Multiplex-menetelmien etuina perinteisiin verrattuna ovat nopeus, kustannustehokkuus sekä pienempi näytemäärä. (Leng ym. 2008.) Multiplex-ELISA-menetelmissä käytetään tyypillisesti virtausytometriaan sekä kemi- ja elektroluminesenssiin perustuvia tekniikoita, joista etenkin elektroluminesenssiin perustuvilla menetelmillä saadaan mitattua hyvin alhaisia pitoisuuksia ja päästään perinteisissä ELISA-

menetelmissä käytettyä värireaktiota parempiin herkkyyksiin. (Halonen 2004a: 76; Leng ym. 2008.) Virtaussytometriset menetelmät perustuvat esimerkiksi värikoodattujen helmien käyttöön kiinteänä faasina (Leng ym. 2008; R&D Systems™ 2014). Näyte ohjataan kulkemaan tasaisena virtana lasersäteen ohi, jolloin tutkittavia molekyylejä voidaan tarkastella yksitellen. Mittauspisteessä tutkittava molekyyli tunnistetaan siroavan valon perusteella ja sen pitoisuus määritetään leiman lähettämän signaalin perusteella. (Mahlamäki 2004: 286.) Helminä voidaan käyttää myös magneettisia partikkeleita, jolloin molekyylit saadaan mittauslaitteen magneettisen alustan avulla eroteltua tasaisesti yhdeksi kerrokseksi määrittämisen ajaksi. Helmiin perustuvissa menetelmissä käytetyt leimat ovat yleensä fluoresoivia tai kuten Magnetic Luminescence® Screening Assay-sovelluksessa streptavidiniin ja biotiinin väliseen reaktioon perustuvia. (Leng ym. 2008; R&D Systems™ 2014.)

Proteiiniarraylla tarkoitetaan proteiinien analysointiin kehitettyjä multiplex-menetelmiä, jolla voidaan tutkia proteiinien ilmenemistä, toimintaa ja vuorovaikutussuhteita muiden molekyylien kanssa. Menetelmät soveltuvat myös hyvin pienten molekyylien tutkimiseen ja auttavat ymmärtämään kuinka molekyylit toimivat yhdessä ja miten niiden toimintaa säädellään. (Hall – Ptacek – Snyder 2007.)

Proteiiniarray-menetelmät voidaan jakaa kolmeen eri menetelmätyyppiin: analyyttiseen, funktionaaliseen ja käänteisfaasimenetelmää. Tässä opinnäytetyössäkin hyödynnettyä analyyttistä menetelmää käytetään tyypillisesti proteiinien ilmenemistasojen, affiniteetin ja spesifisyyden tarkasteluun. Menetelmä perustuu ELISA-menetelmän lailla kiinteäfaasitekniikkaan. Kiinteänä faasina toimii lasinen mikrosiru, johon on kiinnitetty näytteestä tutkittavien molekyylien kanssa komplekseja muodostavia vasta-aineita, aptameereja tai affibodeja. Alustalle voidaan rakentaa niin sanottu proteiinikirjasto, jonka avulla on mahdollista tarkastella samanaikaisesti useita eri proteiineja. Havainnointiin käytetään useimmiten fluoresoivia leimoja, mutta myös esimerkiksi radioisotooppien käyttö on mahdollista. (Hall ym. 2007.)

## 4 Opinnäytetyön toteutus

Opinnäytetyön varsinainen työvaihe toteutettiin Medix Biochemican tiloissa Kauniaisissa kevättalvella 2015. Työtä ohjasi Medix Biochemicalla FT Juuso Juhila, ohjaavana opettajana toimi lehtori Hannele Pihlaja.

Koska opinnäytetyö oli osa suurempaa, Medix Biochemicalla jo käynnissä olevaa projektia, aloitettiin opinnäytetyö analysoimalla aiemmin Medix Biochemican toimesta RayBio® Biotin Label-based Human Antibody Array 1-sovelluksella emätineritenäytteistä tehdyn määrittelyn tuloksia. Analyysin perusteella valittiin 20 merkkiainetta Magnetic Luminex® Screening Assay-proteiinimäärittelyyn, joka tehtiin lapsivesipunktiosta kerätyistä näytteistä. Osa proteiineista valittiin määritettäväksi suuremmalla näyttemäärällä ELISA-testeissä.

#### 4.1 Näytteet

Projektia varten oli kerätty näytteitä Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiirin Naistentautien ja synnytysten yksikössä. Näytteet olivat punktoituja lapsivesiä sekä tarkoitukseen sopivalla näytetikulla kerättyjä emätineritenäytteitä. Kliinisestä näytteenotosta oli etukäteen laadittu yksityiskohtainen toimintaohje, joka oli hyväksytty eettisessä toimikunnassa. Hoitoyksikön henkilökunta oli perehdytetty näytteenottoon ja tutkimushuoneisiin oli sijoitettu tutkimuskansio sekä näytekitit tutkimusnäytteiden ottamista varten. Kaikki näytteet pakastettiin ja koodattiin siten, että sairaala pystyy tarvittaessa jäljittämään potilaan.

RayBio® Biotin Label-based Human Antibody Array 1-sovelluksella tehtyyn määrittelyyn oli käytetty emätineritenäytteitä, jotka oli kerätty odottavilta äideiltä eri raskauden vaiheissa. Ensimmäinen näyte (A) oli otettu raskausviikolla 10+4–14+0 ja toinen näyte (B) raskausviikolla 17+0–20+4 normaaleiden raskausajan kontroleihin kuuluvien tutkimusten yhteydessä. Kolmas näyte (C) otettiin mahdolliseen uhkaavaan enneaikaiseen synnytykseen viittaavien oireiden takia päivystykseen tulleilta. Odottavien äitien kliinisten tietojen perusteella näytteet oli jaettu kolmeen kategoriaan: oireeton normaaliaikainen raskaus (a. verrokki), oireinen normaaliaikainen raskaus (b. verrokki) sekä oireinen raskaus, joka päättyi enneaikaiseen synnytykseen (c. kohderyhmä). Näyteryhmien muodostuminen on havainnollistettu liitteessä 1. Opinnäytetyötä tehtäessä tuloksia oli saatavilla 13 kohderyhmään kuuluvasta ja 14 verrokkiodottajasta.

Magnetic Luminex® Screening Assay ja ELISA-testit tehtiin lapsivesinäytteistä. Tutkimuksen kohderyhmään kuuluvat lapsivesinäytteet oli kerätty pääasiassa enneaikaisten supistusten takia hoitoon tulleilta potilailta, joilla epäiltiin kohdunsisäistä infektiota. Verrokinäytteet oli kerätty potilailta, joille lapsivesipunktio tehtiin esimerkiksi raskaus-

diabeteksen tai geenidiagnostiikan takia. Tutkimusnäytteidenotosta ei aiheutunut ylimääräistä riskiä äidin tai sikiön terveydelle, sillä lapsivesipunktio tehtiin potilaille joka tapauksessa. Lapsivesipunktio ei kuitenkaan ole täysin riskitön toimenpide, vaan siihen liittyy aina hieman kohonnut keskenmenoriski. Lapsivesipunktio tehdään aina harkiten ja punniten sen riskiä suhteessa vallitsevaan tilanteeseen. (Ryynänen 2015: 360–361.)

Lapsivesinäytteitä saatiin opinnäytetyön aikana kaiken kaikkiaan 250, joista 53 oli tutkimusnäytteitä ja 197 verrokkeja. Magnetic Luminex® Screening Assaylla näistä tutkittiin 14 tutkimusnäytettä ja 14 verrokkia. ELISA-kiteillä ehdittiin opinnäytetyön aikana testata merkkiaineesta riippuen 45–53 tutkimusnäytettä ja 71–118 verrokkia.

## 4.2 Työvaiheet ja käytettävät menetelmät

Tutkittavista näytteistä määritettiin proteiineja, joiden pitoisuuksien muutoksia voitaisiin mahdollisesti käyttää kohdunsisäisen infektion tunnistamisessa. Määrittelyssä käytettiin tunnettuja, kaupallisia kvantitatiivisia immunokemiallisia menetelmiä.

### 4.2.1 RayBio® Biotin Label-based Human Antibody Array 1

Työn lähtökohtana käytettiin RayBio® Biotin Label-based Human Antibody Array 1-sovelluksella tehtyä määrittystä, jossa emättimen kautta otetuista näytteistä oli mitattu 507 proteiinin ilmenemistasot. Määrittelyssä oli mukana muun muassa sytokiineja, kemokiineja, kasvutekijöitä ja proteaaseja. Tarkempi listaus proteiineista on esitetty liitteessä 2. Erona kaksoisvasta-aine-ELISA-tekniikkaan menetelmässä ei käytetä biotinyloitua kaksoisvasta-ainetta, vaan näytteestä tutkittavat proteiinit, antigeenit, leimataan määrittelyn alussa biotiinilla. Antigeenien havaitsemiseen menetelmässä käytetään fluoresoivalla värillä leimattua streptavidiniä. (RayBiotech, Inc. 2009.) Määrittelyn käytännöntyö oli tehty aiemmin Medix Biochemicalla ja mittaukset sekä tulosten alustava käsittely, kuten normalisointi, oli tehty tilaustyönä VTT:llä kitin valmistajan ohjeiden mukaisesti.

Opinnäytetyötä varten tehtävässä tulosten analysoinnissa tutkittiin proteiineista määritettyjen intensiteettien muutosta eri aikapisteiden välillä ja arvioitiin mahdollisia eroja tutkimus- ja verrokinäytteiden mittaustuloksissa. Vertailua tehtiin kahdella tavalla: Ensimmäisessä vertailussa tarkasteltiin tutkimus- että verrokinäytteiden eroja eri aikapis-

teissä. Tämä tehtiin laskemalla ensin proteiinikohtaiset keskiarvot jokaiselle aikapisteelle määritetyistä intensiteeteistä sekä tutkimus- että verrokinäytteille. Tämän jälkeen tarkasteltiin keskiarvojen muutoksia näyteryhmien välillä. Proteiinit listattiin muutoksen suuruuden ja suunnan mukaan, jolloin voitiin erottaa proteiinit, joiden ilmenemisen muutokset ryhmien välillä olivat suurimmat, ja nähdä kumman ryhmän suuntaan ilmeneminen painottui.

Toisessa vertailussa laskettiin ensin yksittäisten potilaiden osalta proteiinikohtaisten intensiteettien muutos eri aikapisteissä (A-B, A-C sekä B-C), minkä jälkeen laskettiin keskiarvot näistä muutoksista sekä tutkimus- että verrokinäytteille. Seuraavaksi laskettiin eri aikapisteiden muutosten muutos tutkimus- ja verrokinäytteiden välillä (case-control). Analyysiä varten jokaista määritettyä proteiinia koodaava geeni etsittiin internetissä vapaasti käytettävissä olevasta GeneCards®-tietokannasta. Muutoksen suuruuden ja suunnan mukaan järjestetyt arvot geeninimien syötettiin bioinformatiikka-ohjelmaan, joka mallinsi arvojen perusteella elimistössä todennäköisesti tapahtuvat biologiset prosessit.

#### 4.2.2 Magnetic Luminex® Screening Assay

Magnetic Luminex® Screening Assay on kaupallinen sovellus, jota voidaan käyttää jopa 50 biologisen merkkiaineen määrittämiseen näytteestä samanaikaisesti multiplex-kaksoisvasta-aine-ELISA-tekniikkaa hyödyntäen. Opinnäytetyössä määrittämiseen valittiin RayBio® Biotin Label-based Human Antibody Array 1-analyysin perusteella 19 proteiinia sekä yksi proteiini, CRP, määrittämisen ulkopuolelta. CRP valittiin mukaan määrittämiseen, koska se on tulehduksen mittaamisessa yleisimmin käytetty merkkiaine. Määrittämiseen valittiin satunnaisotannalla 14 tutkimusnäytettä sekä kyseisille näytteille raskeusviikkojen suhteen vastaavat verrokkit. Määrittämisessä näytteistä käytettiin kolmea eri laimennosta (1:5, 1:50 ja 1:500).

Menetelmässä kaksoisvasta-aine on leimattu biotiinilla, joka substraattina käytetyn streptavidini-PE:n (phycoerythrin) kanssa reagoidessaan synnyttää fluoresoivan reaktiotuotteen. Perinteisestä ELISA-määrittämisestä poiketen ei ensisijaisia vasta-aineita Magnetic Luminex® Screening Assayssa ole etukäteen kiinnitetty kuoppalevyn kaivoihin, vaan ne lisätään reaktioon värimerkittyihin magneettipartikkeleihin liitettynä. (R&D Systems™ 2014.) Määrittäminen tehtiin valmistajan ohjeiden mukaisesti. Reaktiovaiheita seuraavat pesuvaiheet tehtiin Bio-Rad® Bio-Plex® Pro-pesuautomaatilla.

Mittaukset suoritettiin Bio-Rad® Bio-Plex® -analysaattorilla. Laite toimii virtausytometriaan perustuvalla kaksoislasertekniikalla. Mittauksen aikana tutkittava näyte ohjataan mittauspisteeseen, jossa siihen osuu kaksi lasersädettä. Toinen säde tunnistaa tutkitavan proteiinin valon sironnan perusteella ja toinen mittaa fluoresenssin voimakkuuden. (R&D Systems™ 2014.)

#### 4.2.3 ELISA-testit

Entsyymiavusteisella immunomääritysmenetelmällä (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) määritettiin aiemmissa työvaiheissa valikoituneiden merkkiaineiden pitoisuudet suuremmasta näytemäärästä. Yksittäisiä proteiineja määritettäessä saatiin laimennuskertoimet asetettua jokaiselle proteiinille erikseen ja siten sopivammalle tasolle. ELISA-testeillä ehdittiin opinnäytetyön aikana määrittää vaihteleva määrä näytteitä. Näytemäärät on kirjattu taulukkoon 2.

Taulukko 2. ELISA-testien näytemäärät (kpl)

Kitti	n (tutkimus)	n (verrokki)
R&D Systemsin Quantikine® ELISA Human MMP-9	53	118
R&D Systemsin Quantikine® ELISA Human CRP	52	71
R&D Systemsin Quantikine® ELISA Human IL-6	50	95
Medix Biochemican IGFBP-1 IEMA (ELISA)	47	112

Opinnäytetyössä käytettiin kahden valmistajan kaupallisia ELISA-kittejä: R&D Systemin Quantikine® ELISA Human MMP-9, Human C-Reactive Protein/CRP ja Human IL-6 sekä Medix Biochemican IGFBP-1 IEMA (ELISA). Sopivat laimennuskertoimet pyrittiin määrittämään ennen varsinaista analyysiä esitestauksella, joka tehtiin kolmella tutkimus- ja kahdella verrokinäytteellä. Esitestauksessa haluttiin nähdä minkä tasoisia absorbansseja näytteistä saataisiin, jotta ne voitaisiin laimentaa kitin standardisuoran lineaariselle alueelle osuviksi. Sekä esitestaukset että varsinaiset määrytykset tehtiin kittien sisältämillä reagensseilla valmistajien ohjeiden mukaan. Määrytykset erosivat toisistaan pääasiassa inkubaatioaikojen suhteen. Reaktiovaiheiden jälkeiset pesut tehtiin 8-kanavaisella Nunc-Immuno™ Wash-pesurilla. Absorbanssit mitattiin Multiscan® EX-mikrolevylukijalla (Thermo Electron Corporation) päätepistemittauksena määri-




tysohjeiden mukaisilla aallonpituuksilla. Multiscan® EX-fotometrin toiminta perustuu pystymittausfotometriaan, jossa valo kulkee koko näytteen läpi ja sen absorptio on suoraan verrannollinen valoa absorboivan aineen määrään näytteessä. (Thermo Electron Oy 2005.)

## 5 Tulokset

### 5.1 RayBio® Biotin Label-based Human Antibody Array 1

RayBio® Biotin Label-based Human Antibody Array 1-määrittelyssä tutkimus- ja verrokinäytteiden välillä havaittavien erojen perusteella valittiin 19 proteiinia Magnetic Luminox® Screening Assay-määrittelyyn. Valintaa tehtäessä päätettiin tarkastella proteiineja, joissa tutkimusnäytteiden ja verrokkien intensiteettien välinen muutos oli suurin ja suuruudeltaan vähintään 50. Näin saatiin rajattua proteiinit 20:een enemmän tutkimusnäytteissä ilmenevään (positiiviset arvot) ja 55:een enemmän verrokinäytteissä ilmenevään (negatiiviset arvot) proteiiniin. Tätä prosessia on kuvattu kuviossa 2. Lopullinen valinta tehtiin näin rajatuista proteiineista kirjallisuuden ja aiemman tutkimustiedon perusteella.

Proteiini	ka (case)	ka (control)	muutos
Proteiini A	17,8	9,7	8,1
Proteiini B	24,1	24,9	-0,8
Proteiini C	203,9	300,1	-96,2
Proteiini D	3,4	8,3	-4,9
Proteiini E	24,8	212,3	-187,5
Proteiini F	1320,6	1044,1	276,5
Proteiini G	42,2	41,1	1,1
Proteiini H	7,6	6,4	1,2
Proteiini I	7,4	114,6	-107,1
Proteiini J	13,3	51,4	-38,0
Proteiini K	220,1	670,9	-450,9
Proteiini L	77,4	186,5	-109,1
Proteiini M	1508,1	3758,3	-2250,2
Proteiini N	294,1	135,5	158,7

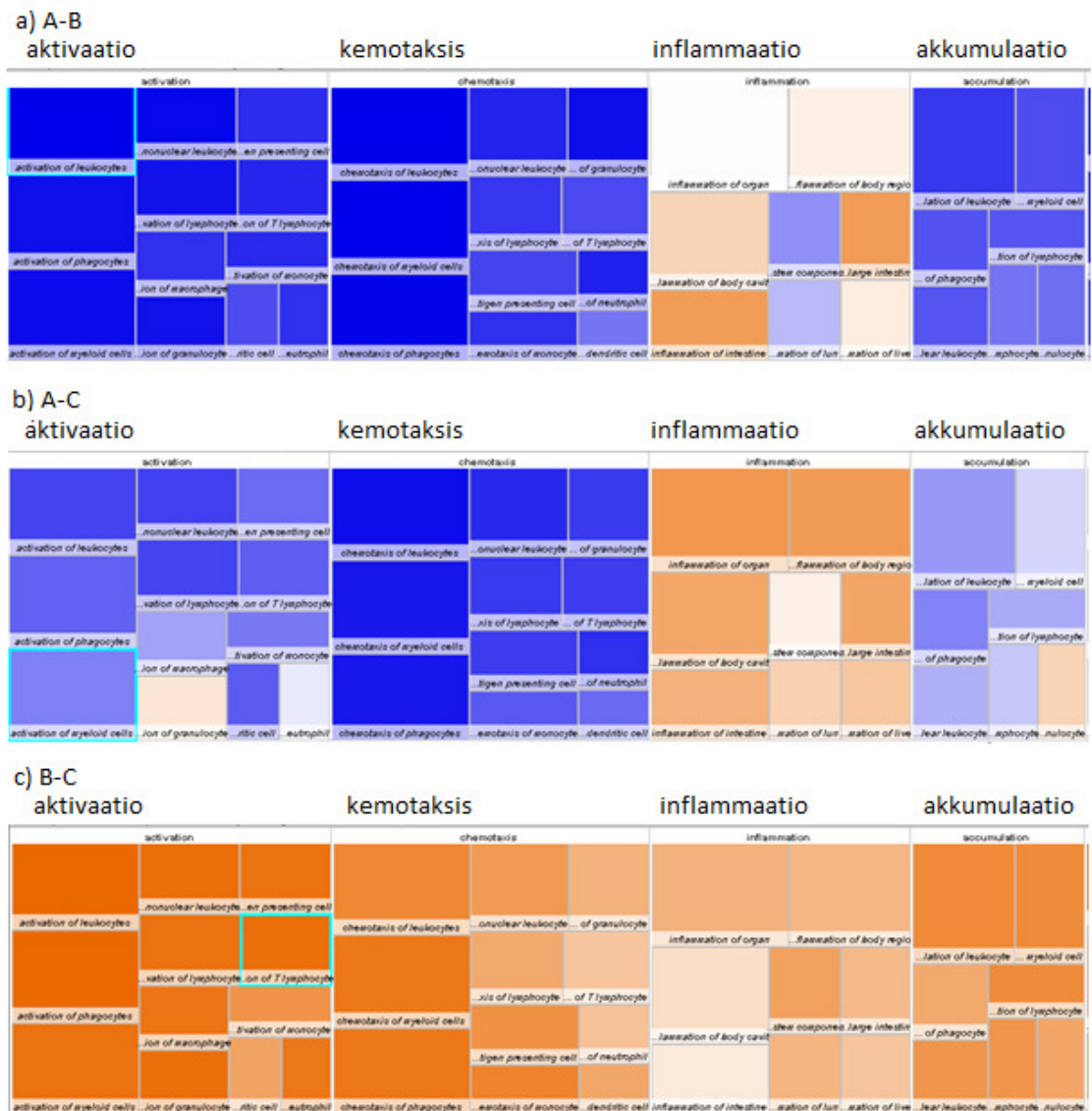


Proteiini	muutos
Proteiini F	276,5
Proteiini K	158,7
Proteiini A	8,1
Proteiini H	1,2
Proteiini G	1,1
Proteiini B	-0,8
Proteiini D	-4,9
Proteiini J	-38,0
Proteiini C	-96,2
Proteiini I	-107,1
Proteiini L	-109,1
Proteiini E	-187,5
Proteiini K	-450,9
Proteiini M	-2250,2

Kuvio 2. Kuvaus proteiinien rajauksesta valintaprosessissa. Kuvio on laadittu prosessia havainnollistamaan esimerkinomaisesti vain muutamilla proteiineilla saatuja arvoja käyttäen.

Kuviossa 3 esitetään pathway-analysointin luomat kuvaajat potilaissa eri aikapisteiden välillä tapahtuneiden muutosten eroista tutkimus- ja verrokinäytteissä. Kuvista nähdään, että ensimmäisen ja toisen raskauskolmanneksen (A-B) sekä ensimmäisen raskauskolmanneksen ja päivystyskäynnin (A-C) välillä immunologiset prosessit, kuten

leukosyyttien, lymfosyyttien, fagosyyttien ja makrofagien aktivaatio ja kemotaksis ovat painottuneet verrokkien suuntaan, vaikka varsinaista kohdekudoksen tulehdusta kuvaavat mekanismit ovat voimistuneet juuri tutkimusnäytteissä. Tämän lisäksi toisen raskauskolmanneksen ja päivystysnäytteiden (B-C) välillä nähdään tutkimusnäytteissä voimakasta lisääntymistä valkosolujen aktivaatiossa, kemotaksiksessa ja lukumäärässä suhteessa verrokkeihin, mikä voi mahdollisesti ennustaa kohdunkaulan lyhenemistä ja synnytyksen käynnistymistä ennenaikaisesti.



Kuvio 4. RayBio® Biotin Label-based Human Antibody Array 1 tulosten analysointi Ingenuity® Pathway Analysis-ohjelmalla. Kuvassa a) on vertailtu aikapisteiden A (1. raskauskolmanneksen) ja B (2. raskauskolmanneksen), kuvassa b) aikapisteiden A ja C (päivystyskäynti) välillä ja kuvassa c) aikapisteiden B ja C välillä tapahtuneiden muutosten tilastollisia eroja tutkimus- ja verrokkinäytteiden välillä. Sinisellä värillä on kuvattu alueet, joissa tapahtumat ovat painottuneet verrokkinäytteiden suuntaan ja oranssilla tutkimusnäytteissä aktiivisemmat immunologiset tapahtumat.

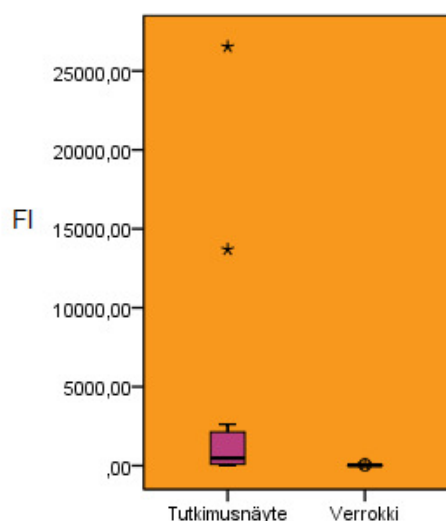
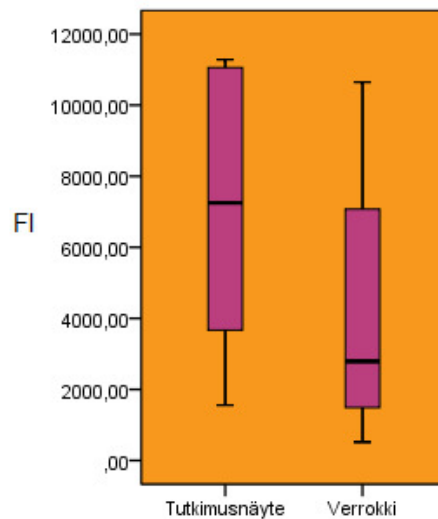
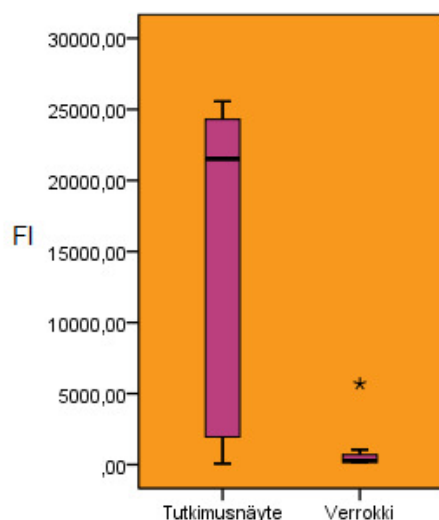
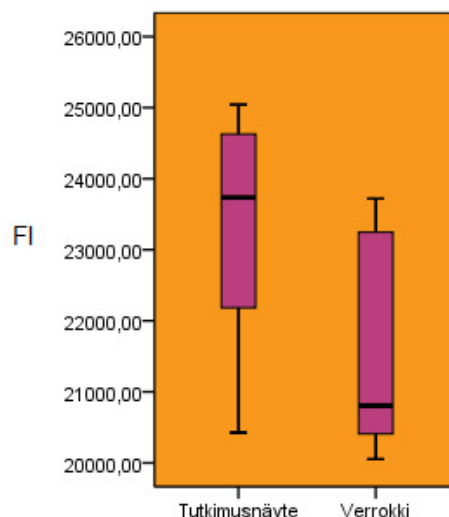
Taulukossa 3 on listattu immunologisia prosesseja, jotka pathway-analyysiohjelma on syötettyjen arvojen perusteella määritellyt tapahtuviksi. Taulukossa ilmoitettu p-arvo kuvaa tapahtuman todennäköisyyttä: mitä pienempi arvo, sitä todennäköisemmin kuvattu prosessi tapahtuu. Taulukosta nähdään myös kuinka moni analysoiduista molekyyleistä osallistuu kyseisiin tapahtumiin.

Taulukko 3. RayBio® Biotin Label-based Human Antibody Array 1 tulosten analysointi Ingenuity® Pathway Analysis-ohjelmalla.

Tapahtuma	Tapahtumiin osallistuvien molekyyliden määrä	a) A-B		b) A-C		c) B-C	
		p-arvo	Aktivaation ennustettu suunta	p-arvo	Aktivaation ennustettu suunta	p-arvo	Aktivaation ennustettu suunta
inflammatory response	211	1,25E-148	Decreased	1,25E-148	Decreased	1,25E-148	Increased
cell movement of phagocytes	181	1,40E-142	Decreased	1,40E-142	Decreased	1,40E-142	Increased
inflammation of organ	232	2,75E-132		2,75E-132	Increased	2,75E-132	
chemotaxis of leukocytes	136	4,13E-118	Decreased	4,13E-118	Decreased	4,13E-118	Increased
inflammation of body region	199	3,05E-116		3,05E-116	Increased	3,05E-116	
activation of leukocytes	170	8,08E-108	Decreased	8,08E-108	Decreased	8,08E-108	Increased
chemotaxis of myeloid cells	117	2,72E-104	Decreased	2,72E-104	Decreased	2,72E-104	Increased
migration of phagocytes	112	1,76E-101	Decreased	1,76E-101	Decreased	1,76E-101	Increased
accumulation of leukocytes	110	6,09E-101	Decreased	6,09E-101		6,09E-101	Increased
activation of phagocytes	125	1,95E-100	Decreased	1,95E-100	Decreased	1,95E-100	Increased
quantity of phagocytes	131	4,35E-100	Decreased	4,35E-100		4,35E-100	
activation of myeloid cells	119	4,96E-97	Decreased	4,96E-97		4,96E-97	Increased
chemotaxis of phagocytes	112	1,08E-96	Decreased	1,08E-96	Decreased	1,08E-96	Increased
inflammation of body cavity	151	1,75E-89		1,75E-89		1,75E-89	
chemotaxis of mononuclear leukocytes	84	4,53E-83	Decreased	4,53E-83	Decreased	4,53E-83	
cell movement of neutrophils	100	1,04E-79	Decreased	1,04E-79	Decreased	1,04E-79	
recruitment of phagocytes	88	4,61E-75	Decreased	4,61E-75	Decreased	4,61E-75	
cell movement of macrophages	91	3,13E-74	Decreased	3,13E-74	Decreased	3,13E-74	Increased
activation of mononuclear leukocytes	116	3,50E-72	Decreased	3,50E-72	Decreased	3,50E-72	Increased
cell movement of monocytes	72	5,85E-69	Decreased	5,85E-69	Decreased	5,85E-69	

## 5.2 Magnetic Luminex® Screening Assay

Magnetic Luminex® Screening Assayssä määritettiin 20 proteiinin ilmenemistasot 14 tutkimus- ja 14 verrokinäytteestä kolmella eri laimennoksella. Tutkittujen proteiinien tasot näytteissä vaihtelivat suuresti, joten laimennoskertoimet eivät kaikkien proteiinien kohdalla osuneet standardisuoran lineaariselle alueella eikä pitoisuuksia siksi saatu määritettyä. Koska tutkimuksen tässä vaiheessa tarkoituksena oli katsoa voidaanko tutkittujen proteiinien ilmenemisen perusteella ylipäänsä erottaa tutkimus- ja verrokkinäytteiden ryhmät toisistaan tällä menetelmällä eikä niinkään määrittää tarkkoja pitoisuuksia, päädyttiin tässä vertailussa käyttämään mittauksessa saatuja fluoresenssi-intensiteettejä pitoisuuksien sijaan.

**MMP-9****CRP****IL-6****IGFBP-1**

Kuvio 4. Fluoresenssi-intensiteettien vertailu tutkimus- ja verrokinäytteiden välillä neljällä Magnetic Luminox® Screening Assaylla määritetyillä proteiineilla. Kuvaajissa laatikko kuvaa aluetta, jonka sisään 50 prosenttia arvoista sijoittuu. Janoilla merkitään korkeintaan 1,5-kertaa laatikon mittainen alue, jolle sijoittuu valtaosa arvoista. Selkeästi poikkeavat arvot on merkitty kuvaajaan yksittäin.

Kuviossa 4 on kuvattu neljän Magnetic Luminox® Screening Assaylla määritetyn proteiinin fluoresenssi-intensiteettien (FI) jakautuminen tutkimus- ja verrokinäytteiden välillä. Kuvioista nähdään, että tutkimus- ja verrokinäytteet eroavat toisistaan IL-6 ja MMP-9-pitoisuuden suhteen. IGFBP-1 ja CRP -pitoisuuksien perusteella näyteryhmiä ei voida yhtä selkeästi erottaa toisistaan. Fluoresenssi-intensiteetin yläraja saavutettiin hie-

man yli 25 000:ssa, joten korkeimmat arvot ovat osassa näytteistä vain suuntaa antavia.

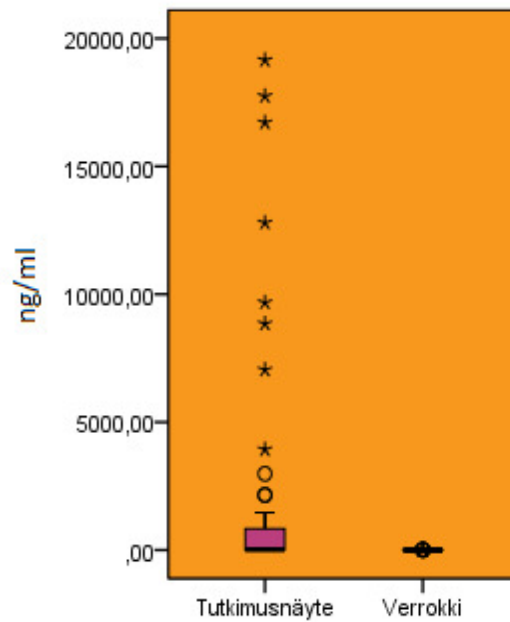
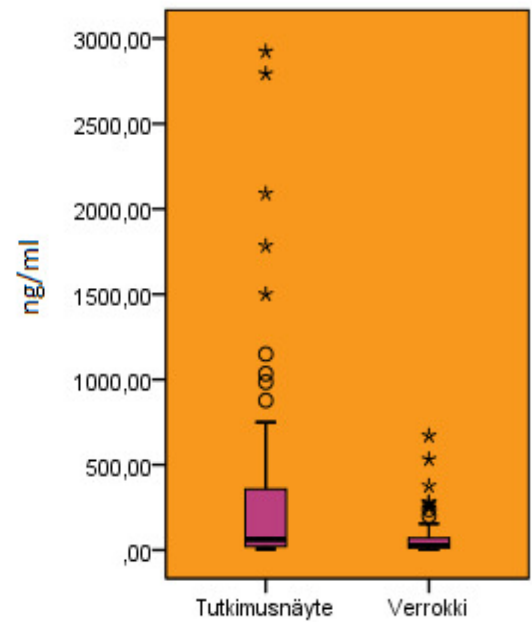
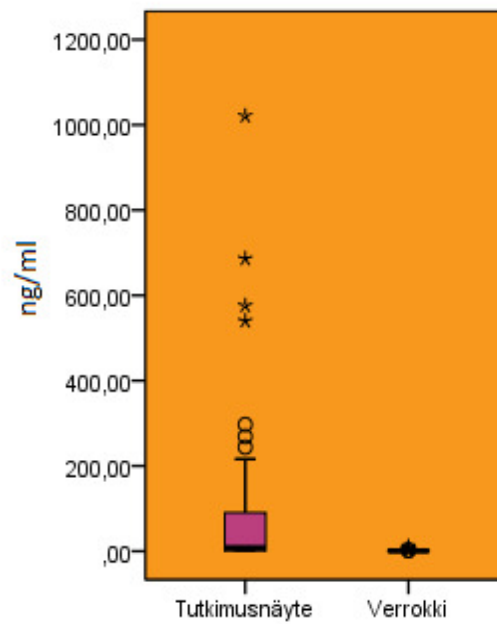
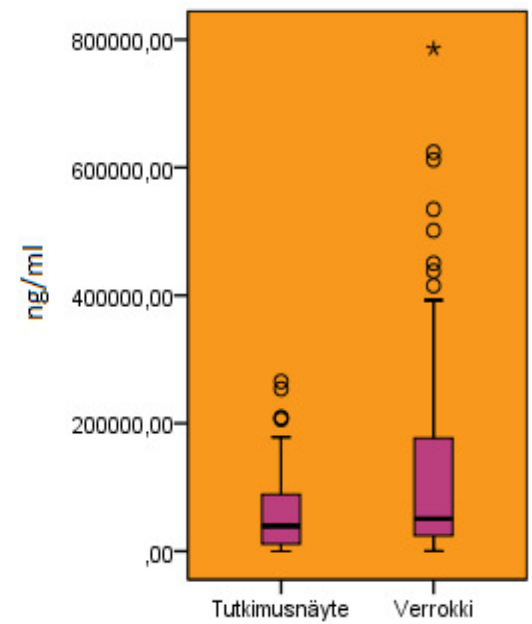
Taulukkoon 4 on kerätty arvoja Magnetic Luminex® Screening Assaysta. Myös taulukkoon kirjattuja arvoja tarkasteltaessa on huomioitava, että fluoresenssi-intensiteetin yläraja saavutettiin noin 25 000:ssa, mikä vaikuttaa etenkin IGFBP-1:n saamiin arvoihin eikä näyteryhmien välistä todellista eroa mahdollisesti nähdä. Tilastollisen analyysin jälkeen voidaan p-arvoista kuitenkin nähdä, että tutkimus- ja verrokinäytteiden välillä nähtävä ero on tilastollisesti merkittävä jopa näin pienellä aineistolla (Independent-Samples Mann-Whitney U-test,  $p < 0,05$ ).

Taulukko 4. Proteiinien vertailu Magnetic Luminex® Screening Assaylla

Proteiini	Näytetyyppi	Näytemäärä	C (minimi)	C (maksimi)	C (keski-arvo)	C (keskihajonta)	p-arvo
MMP-9	tutkimusnäyte	14	17	26532,5	3549,8	7507,8	0,000
	verrokki	14	4	84	26,2	20,6	
CRP	tutkimusnäyte	14	1554,3	11281,3	7057,7	4066,8	0,021
	verrokki	14	515,8	10647,8	4393,1	3698,1	
IL-6	tutkimusnäyte	14	66	25568	15971,7	10440,1	0,000
	verrokki	14	129	5687	779,2	1445,0	
IGFBP-1	tutkimusnäyte	14	20427,8	25042,8	23355,2	1580,8	0,003
	verrokki	14	20055,3	23718,8	21533,3	1411,6	

### 5.3 ELISA

Kuviossa 5 on kuvattu neljän ELISA-testeillä määritetyn proteiinin ilmenemistä tutkimus- ja verrokinäytteissä. Kuvaajissa laatikko kuvaa aluetta, jonka sisään 50 prosenttia arvoista sijoittuu. Kuvaajissa nähdään tutkimus- ja verrokinäytteiden jakautuminen MMP-9-, CRP-, IL-6- sekä IGFBP-1-pitoisuuksien suhteen.

**MMP9****CRP****IL6****IGFBP1**

Kuvio 5. Tutkimus- ja verrokinäytteiden jakautuminen neljän eri proteiinipitoisuuden suhteen ELISA-testeissä. Kuvaajissa laatikko kuvaa aluetta, jonka sisään 50 prosenttia arvoista sijoittuu. Janoilla merkitään korkeintaan 1,5-kertaa laatikon mittainen alue, jolle sijoittuu valtaosa arvoista. Selkeästi poikkeavat arvot on merkitty kuvaajaan yksittäin.

Taulukkoon 5 on kerätty arvoja ELISA-testeillä määritetyistä proteiineista. p-arvoista nähdään, että tutkimus- ja verrokinäytteissä nähtävä ero on tilastollisesti merkittävä MMP-9:n, IL-6:n ja CRP:n osalta (Independent Samples Kruskal-Wallis Test,  $p < 0,05$ ).

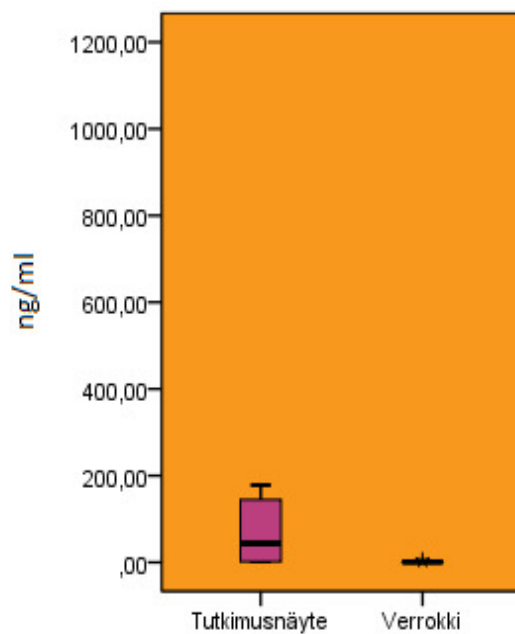
Taulukko 5. Proteiinien vertailu ELISA-testien tulosten perusteella

Proteiini	Näytetyyppi	Näytemäärä	C (minimi)	C (maksimi)	C (keski-arvo)	C (keskihajonta)	p-arvo
MMP-9	tutkimusnäyte	53	0,7	19152	2055,5	4724,7	0,000
	verrokki	118	0,2	19	2,6	2,4	
CRP	tutkimusnäyte	52	5	2923	397,3	687,3	0,002
	verrokki	71	3	670	77,7	121,2	
IL-6	tutkimusnäyte	51	0,03	1021	97,8	201,2	0,000
	verrokki	95	0,03	10,6	0,88	1,4	
IGFBP-1	tutkimusnäyte	47	42	265340	65578,3	73160,3	0,052
	verrokki	113	108	785880	114886,7	150599,9	

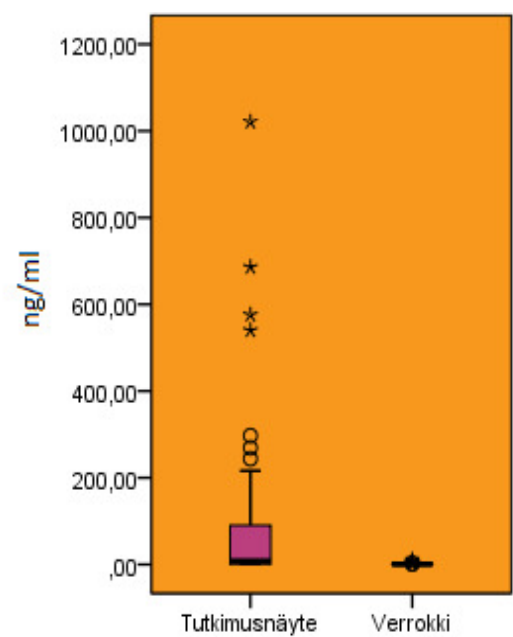
#### 5.4 Magnetic Luminex® Screening Assayn ja ELISA-testien vertailu

Kuviossa 6 on vertailtu Magnetic Luminex® Screening Assaylla ja ELISA-testeillä saatuja tuloksia. ELISA-määritykset on tehty suuremmalla näytemäärällä, mikä vaikuttaa hieman tulosten hajontaan. IL-6 ja CRP osuivat Magnetic Luminex® Screening Assayssa lineaariselle alueelle kahdella eri laimennoksella. Tässä vertailussa on käytetty keskiarvoa näillä laimennoksilla saaduista pitoisuuksista. Tuloksissa on nähtävissä fluoresenssi-intensiteetin katon vastaan tuleminen Magnetic Luminex® Screening Assayssa: tarkasteltaessa proteiinipitoisuuksia voidaan nähdä kuvaajien samankaltaisuus, kun tarkastelun ulkopuolelle jätetään ELISA-testeissä saadut muutamat korkeimmat arvot.

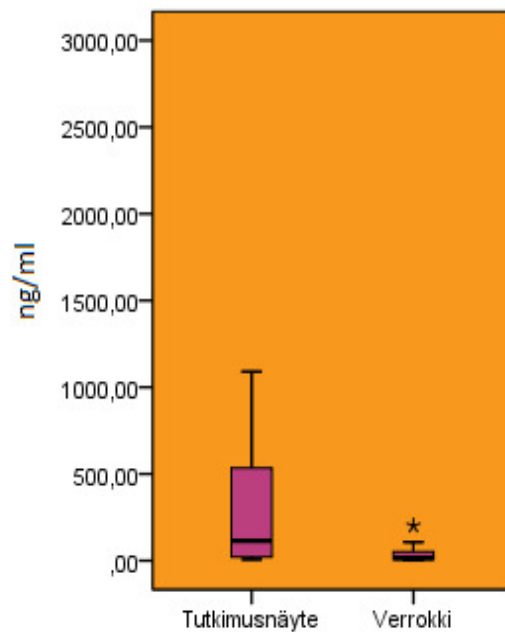
IL6 (Luminex)



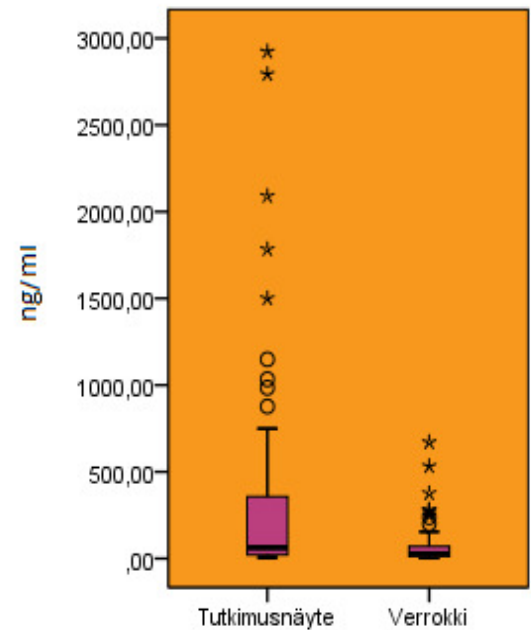
IL6 (ELISA)



CRP (Luminex)



CRP (ELISA)



Kuvio 6. Magnetic Luminex® Screening Assaylla ja ELISA-testeillä saatujen tulosten vertailu. Magnetic Luminex® Screening Assaylla on määritetty satunnaisotannalla valittu ryhmä näytteistä, joista suurempi otos määritetty ELISA-testeillä. Kuvaajissa laatikko kuvaa aluetta, jonka sisään 50 prosenttia arvoista sijoittuu. Janoilla merkitään korkeintaan 1,5-kertaa laatikon mittainen alue, jolle sijoittuu valtaosa arvoista. Selkeästi poikkeavat arvot on merkitty kuvaajaan yksittäin.



## 6 Pohdinta

Tutkimuksessa pyrittiin kartoittamaan ennenaikaiseen synnytykseen ja kohdunsisäiseen infektiin liittyviä biologisia merkkiaineita määrittämällä emätinerite- ja lapsivesinäytteiden proteiinipitoisuuksia. Tarkoituksena oli pyrkiä löytämään eroja tutkimus- ja verrokinäytteiden välillä sekä saada mahdollisesti uutta tietoa ennenaikaisen synnytyksen ja kohdunsisäisen infektion syntymekanismeista. Tämän lisäksi vertailtiin erilaisia immunokemiallisia määritysmenetelmiä ja niillä saatuja tuloksia toisiinsa. Opinnäytetyöhön käytettävissä oleva aika oli rajallinen ja proteiineja testattiin ajan sallimissa määrin. Koska opinnäytetyö oli osa suurempaa tutkimus- ja kehittämistyöprojektia (SaWe: "Get it Done"), jossa Medix Biochemica on osallisena, jatkuvat tutkimukset opinnäytetyön valmistumisen jälkeen Medix Biochemican tuotekehitysryhmän toimesta.

### 6.1 Eettiset kysymykset

Potilasnäytteiden käyttöön liittyy aina eettisiä kysymyksiä. Lääketieteellistä tutkimusta säädellään tutkimus- tai kudoslaissa sen mukaan, kerätäänkö näytteet tutkimusta varten vai käytetäänkö tutkimuksessa jo olemassa olevia näytteitä. Huolimatta siitä, kumman lain piirissä toimitaan, on potilasnäytteiden käyttöön aina oltava luovuttajan suostumus, jonka hän voi halutessaan perua koska tahansa. Potilasnäytteitä käsiteltäessä tulee aina toimia luottamuksellisesti ja yksityisyyden suojaa kunnioittaen. Kerätessä näytteitä tutkimusta varten, tulee potilaan etu ja turvallisuus asettaa aina tieteen edelle. Lisäksi tutkimuksesta saatavan odotettavissa olevan hyödyn on oltava tutkittavalle näytteenotosta mahdollisesti aiheutuvia riskejä suurempi. (Mäenpää 2012: 9-12.)

Tässä tutkimuksessa näytteet eroteltiin toisistaan juoksevan potilasnumeron perusteella eikä näytteitä tai numeroita yhdistetty potilastietoihin missään vaiheessa tutkimusta. Näytteet kerättiin potilailta, joille lapsivesipunktio tehtiin huolimatta siitä, osallistuiko hän tutkimukseen. Näytteiden käsittelyssä ja tutkimusta suoritettaessa noudatettiin hyvää tieteellistä käytäntöä sekä huolellisia ja luotettavia työskentelytapoja. Näytteiden keräyksestä laadittu toimintasuunnitelma oli hyväksytetty ennen tutkimuksen aloittamista eettisellä toimikunnalla.

## 6.2 Tulosten tarkastelu, luotettavuus ja johtopäätökset

### 6.2.1 RayBio® Biotin Label-based Human Antibody Array 1

RayBio® Biotin Label-based Human Antibody Array 1-määrittelyssä analysoidujen näytteiden määrä oli vähäinen eikä käytettävissä ollut tietoa siitä, oliko ennenaikaisesti synnyttäneillä äideillä todettu kohdunsisäistä infektiota. Lisäksi näytemateriaali RayBio® Biotin Label-based Human Antibody Array 1:ssa poikkesi Magnetic Luminex® Screening Assayssa ja ELISA-testeissä käytetyistä lapsivesinäytteistä eivätkä tulokset siis ole täysin vertailukelpoisia keskenään. Koska kuitenkin jopa 40 prosenttia ennenaikaisista synnytyksistä aiheutuu kohdunsisäisistä infektioista (Ennenaikainen synnytys 2011), arvioitiin RayBio® Biotin Label-based Human Antibody Array 1-määrittelyssä saadut tulokset käyttökelpoiseksi lähtökohdaksi työn seuraaville vaiheille.

RayBio® Biotin Label-based Human Antibody Array 1-määrittelyn tuloksissa oli nähtävissä jonkin verran polarisoitumista eli potilaiden välisissä arvoissa havaittiin kahtia jakautumista. Tämä saattaa aiheuttaa vääristymää keskilukuja tarkasteltaessa. Polarisoitumisesta aiheutuvaa virhettä pyrittiin minimoimaan aikapisteiden välisten potilas-kohtaisten muutosten huomioimisella ennen keskiarvojen laskemista.

RayBio® Biotin Label-based Human Antibody Array 1-määrittelyssä saatujen tulosten perusteella päästiin pathway-analyysiohjelman kautta tarkastelemaan ennenaikaisen synnytyksen syihin mahdollisesti liittyviä fysiologisia prosesseja. Analyysien perusteella voitiin ennenaikaisesti synnyttäneiden potilaiden näytteissä havaita tulehduksellisten tapahtumien lisääntymistä sekä niihin liittyvien proteiinien pitoisuuksien kasvua. Analysointiin oli opinnäytetyössä käytettävissä kuitenkin pieni näytemäärä sekä tyypilliseen pathway-analyysiin verrattuna vähän proteiineja, mikä osaltaan vaikuttaa tulosten luotettavuuteen ja yleistettävyyteen. Pathway-analyysiohjelmaa käytetään yleisesti analysoitaessa tuloksia jopa tuhansien samanaikaisesti määritettyjen geenien ilmenemistasoista. Oli mielenkiintoista havaita, että myös proteiiniarraysta saaduilla tuloksilla voitiin nähdä tilastollisesti merkittäviä tilastollisesti merkittäviä eroja biologisissa mekanismeissa tutkimus- ja verrokinäytteiden välillä. Tämä tosin vaati keskittymistä ainoastaan immunologisiin prosesseihin, koska käytetty proteiiniarray sisälsi lähinnä niihin liittyviä proteiineja.

### 6.2.2 Magnetic Luminex® Screening Assay ja ELISA-määritykset

Magnetic Luminex® Screening Assaylla oli mahdollista määrittää vain rajallinen määrä näytteitä. Näytemäärää saatiin kuitenkin ELISA-testeillä kasvatettua lähempään tarkasteluun valituilla proteiineilla. Vertailtaessa Magnetic Luminex® Screening Assayn ja ELISA-määritysten tuloksia, voitiin havaita hajonnan olevan varsin samankaltainen vaikka satunnaisotannalla valittu näytemäärä oli pieni. Lapsivesinäytteet oli lisäksi pakastettu yhtä käyttökertaa vastaaviksi eriksi, jotta voitiin välttää näytteiden koostumuksen muuttuminen ja proteiinien hajoaminen toistuvien sulatus-pakastuskertojen seurauksena.

Ongelmana Magnetic Luminex® Screening Assayssa oli sopivan laimennoskertoimen löytyminen, kun määritettävänä oli useita proteiineja, joiden pitoisuudet näytteissä vaihtelivat suuresti. Tässä opinnäytetyössä Magnetic Luminex® Screening Assayn perusteella valikoitiin tutkimus- ja verrokinäytteiden suhteen toisistaan eroavia proteiineja, mikä saatiin tehtyä fluoresenssi-intensiteettien perusteella, vaikkei laimennoskertoimien tarkempaan määrittämiseen ollutkaan aikaa. Vastaavanlaiseen kartoittamiseen voidaan Magnetic Luminex® Screening Assayta käyttää projektissa jatkossakin, mutta laimennoskertoimet erilaisille näytteille tulee määrittää etukäteen.

ELISA-testien tulosten oikeellisuus pyrittiin varmistamaan määrittämällä näytteiden kanssa samanaikaisesti kittiin mahdollisesti kuuluvat kontrollinäytteet. Standardit, kontrollit ja näytteet määritettiin ELISA-testeissä aina kahtena rinnakkaisena ja näytteille määritettiin laimennoskertoimet niin, että absorbanssit osuivat standardisuoran mukaiselle lineaariselle alueelle. Määritykset suunniteltiin siten, että samassa määrittämisessä oli mukana suhteessa yhtä paljon tutkimus- ja verrokinäytteitä, jotta saataisiin minimoitua määritysten välisten erojen vaikutus tuloksiin.

Kaikki käytetyt kitit oli tarkoitettu käytettäväksi seerumi- ja soluviljelynäytteille. Opinnäytetyössä näytemateriaalina oli lapsivesi. Lapsivesi vaikutti kuitenkin koostumuksensa perusteella soveltuvan määritettäväksi käytetyillä testeillä menetelmäohjeiden mukaisesti, joskin laimennoskertoimet poikkesivat menetelmäohjeissa seerumi- ja soluviljelynäytteille ohjeellisiksi kertoimiksi annetuista. Jos seerumi- ja soluviljelynäytteille laaditut ohjeet poikkesivat toisistaan esimerkiksi puskurien osalta, käytettiin työssä seeruminäytteille suunnattua ohjetta.

ELISA.-määritysten ongelmana olivat joidenkin tutkittavien proteiinien vaatimat suuret laimennokset, jotka saattoivat aiheuttaa tuloksiin virhettä. Laimennokset tehtiin sarjoina siten, että suurin käytetty yksittäinen laimennos oli 1:50. Pääasiassa pyrittiin käyttämään tätä pienempiä laimennoksia. Pienin pipetoitu tilavuus laimennoksia tehtäessä oli viisi mikrolitraa. Laimennoskertoimien määrittäminen yksittäisille näytteille oli työlästä, sillä proteiinipitoisuudet vaihtelivat suuresti paitsi tutkimus- ja verrokinäyteryhmien, myös yksittäisten näytteiden välillä.

Tulosten perusteella voidaan nähdä tilastollisesti merkittäviä eroja tutkimus- ja verrokinäytteiden proteiinipitoisuuksissa. Opinnäytetyön aikana tutkituista proteiineista erot tulevat selkeimmin esiin MMP-9- ja IL-6-pitoisuuksissa. ELISA-määritysten mukaan MMP-9-pitoisuuksien keskiarvo oli tutkimusnäytteissä 2055,5 ng/ml, jakaantuen välille 0,7-19152 ng/ml ja verrokeissa 2,6 ng/ml, välillä 0,2-19 ng/ml. IL-6:n kohdalla vastaavat pitoisuudet tutkimusnäytteille olivat 97,8 ng/ml (0,03-1021 ng/ml) ja verrokeille 0,88 (0,03-10,6 ng/ml). Aivan pienimpien arvojen kohdalla pitoisuuksissa on päällekkäisyyttä. Opinnäytetyössä saatujen tulosten perusteella sekä MMP-9 että IL-6 saattaisivat siis olla mahdollisia merkkiaineita, joita voitaisiin tulevaisuudessa hyödyntää kohdunsisäisen infektion diagnosoinnissa ja ennenaikaisen synnytyksen ennustamisessa. Tämä vahvistaa myös aikaisempien tutkimusten tuloksia.

### 6.3 Tulosten hyödyntäminen, tulevaisuus ja jatkotutkimusmahdollisuudet

Työn aikana saadut tulokset vievät eteenpäin tutkimus- ja kehittämistyöprojektia, jonka osana opinnäytetyö tehtiin. Opinnäytetyön päätyttyä projekti jatkuu Medix Biochemican tutkimus- ja tuotekehitysryhmän toimesta. Projektin aikana tullaan tarkastelemaan lähemmin proteiineja, joita opinnäytetyön aikana ei ehditty määrittää ja päätökset jatkosta tehdään syntyvien tulosten perusteella.

Mielenkiintoinen jatkotutkimuskohde olisi myös tarkemmin ja suuremmalla näyte- ja merkkiainemäärällä tutkia ilmiötä, joka havaittiin RayBio® Biotin Label-based Human Antibody Array 1-määrittelyn tuloksia pathway-analyysiohjelmassa tarkasteltaessa.

## Lähteet

- Actim-tuotteet. Medix Biochemica. Verkkodokumentti. <[https://www.medixbiochemica.com/Actim\\_tests/Actim\\_Products/fi\\_FI/Actim\\_Tuotteet\\_1/](https://www.medixbiochemica.com/Actim_tests/Actim_Products/fi_FI/Actim_Tuotteet_1/)>. Luettu 18.9.2014.
- Agrawal, Varkha – Hirsch, Emmet 2012. Intrauterine infection and preterm labor. *Semin Fetal Neonatal Med.* 17 (1). 12–19.
- Athayde, Neil – Edwin, Samuel S. – Romero, Roberto – Gomez, Ricardo – Maymon, Eli – Pacora, Percy – Menon, Ramkumar 1998. A role for matrix metalloproteinase-9 in spontaneous rupture of the fetal membranes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 179 (5). 1248–1253.
- Burmester, Gerd-Rüdiger – Pezzutto, Antonio 2003. *Color Atlas of Immunology.* Stuttgart, Germany: Georg Thieme Verlag. 82–83.
- Ekholm, Eeva – Alanen, Anna 2012. Kohdunsisäinen bakteeritulehdus. *Suomen Lääkärilehti* 67 (50–52). 3762–3767.
- El-Bastawissi, A. Y. – Williams, M. A. – Riley, D. E. – Hitti, J. – Krieger, J. N. 2000. Amniotic fluid interleukin-6 and preterm delivery: a review. *Obstetrics & Gynecology.* 95 (6 Pt 2). 1056–1064.
- Ennenaikainen synnytys. Käypä hoito-suositus. Suomalaisen lääkäriseura Duodecimin ja Suomen Gynekologiyhdistyksen asettama työryhmä. Verkkodokumentti. Helsinki: Suomalainen lääkäriseura Duodecim 2011 (10.1.2011). <<http://www.kaypahoito.fi>>. Artikkelin tunnus: hoi50089 (050.089). Luettu 25.11.2014.
- Eskola, Kaarina – Hytönen, Eeva 2002. Nainen hoitotyön asiakkaana. Porvoo: Werner Söderström Osakeyhtiö. 142, 145–146, 190–192.
- Gerry, D – Figueroa, R. – Agüero-Rosenfeld, M. – Martinez, E. – Visintainer, P. – Tejani, N. 1996. A comparison of rapid amniotic fluid markers in the prediction of microbial invasion of the uterine cavity and preterm delivery. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 175 (5). 1336–1341.
- Hall, David A. – Ptacek, Jason – Snyder, Michael 2007. Protein microarray technology. *Mechanisms of Ageing and Development.* 128 (1). 161–167.
- Halonen, Toivo 2004a. Fotometriset menetelmät. Teoksessa Penttilä, Ilkka (toim.): *Kliiniset Laboratoriotutkimukset.* Porvoo: WS Bookwell Oy. 76.
- Halonen, Toivo 2004b. Immunokemiallisten menetelmien periaatteet. Teoksessa Penttilä, Ilkka (toim.): *Kliiniset Laboratoriotutkimukset.* Porvoo: WS Bookwell Oy. 90–100.
- Harirah H. – Donia S. E. – Hsu C. D. 2002. Amniotic fluid matrix metalloproteinase-9 and interleukin-6 in predicting intra-amniotic infection. *Obstetrics & Gynecology.* 99 (1). 80–84.
- Helmig, B. R. – Romero, R. – Espinoza, J. – Chaiworapongsa, T. – Bujold, E. – Gomez, R. – Ohlsson, K. – Uldbjerg, N. 2002. Neutrophil elastase and secretory leukocyte protease inhibitor in prelabor rupture of membranes, parturition and intra-amniotic infection. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine.* 12 (4). 237–246.

Hänninen, Arno 2011. Lymfosyyttien aktivaatio. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti (toim.): Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet, kirja 2. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 89–100.

Jarva, Hanna – Meri, Seppo 2011. Immuunipuolustus eri ikäkausina: Raskaus. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti (toim.): Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet, kirja 2. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 187–190.

Kekki, Minnamaija – Paavonen, Jorma 2003. Mistä ennenaikainen synnytys johtuu? Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim. 119 (12). 1137–1145.

Kidokoro, K. – Furuhashi, M. – Kuno, N. – Ishikawa, K. 2006. Amniotic fluid neutrophil elastase and lactate dehydrogenase: association with histologic chorioamnionitis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 85 (6). 669–674.

Kim, K. W. – Romero, R. – Park, H. S. – Shim, S. S. – Jun, J. K. – Yoon, B. H. 2007. A rapid matrix metalloproteinase-8 bedside test for the detection of intraamniotic inflammation in women with preterm premature rupture of membranes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 197 (3). e1–5.

Kirkinen, Pertti – Ryyänen, Markku 2011. Prenataalidiagnostiikka. Teoksessa Ylikorkiala, Olavi – Tapanainen, Juha (toim.): Naistentaudit ja synnytykset. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 364–365.

Koivisto, Veikko 1994. Insuliinin kaltainen kasvutekijä diabeteksen hoidossa. Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim. 110 (23-24). 2197.

Korhonen, Riku – Moilanen, Eeva 2014. Interleukiini-6. Teoksessa Pelkonen, Olavi – Ruskoaho, Heikki – Hakkola, Jukka – Huupponen, Risto – MacDonald, Ewen – Moilanen, Eeva – Pasanen, Markku – Scheinin, Mika – Vähäkangas, Kirsi (toim.): Lääketieteellinen farmakologia ja toksikologia. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. Saatavilla sähköisesti (käytettävissä tunnuksilla): <<http://www.terveysportti.fi>>. Artikkelin tunnus: Ift00086 (009.088). Luettu 1.3.2015.

Korvenranta, Emmi – Lehtonen, Liisa – Rautava, Liisi – Häkkinen, Unto – Andersson, Sture – Gissler, Mika – Hallman, Mikko – Leipälä, Jaana – Peltola, Mikko – Tammela, Outi – Linna, Miika 2010. Impact of very preterm birth on health care costs at five years of age. *Pediatrics* 125 (5). e1109–1114

Kurkinen-Räty, Merja 2000. Preterm Birth and Preterm Infant: A Clinical Study of certain Etiological and Diagnostic Factors, and the Outcome of Infants. Väitöskirja. Department of Obstetrics and Gynaecology. University of Oulu. 25-26, 54

Leng, Sean X. – McElhaney, Janet E. – Walston, Jeremy D. – Xie, Dongxu – Fedarko, Neal S. – Kuche, George A. 2008. Review article: ELISA and Multiplex Technologies for Cytokine Measurement in Inflammation and Aging Research. *The Journal of Gerontology*. 63 (8): 879-884.

Litmanen, Kirsi 2015. Istukka, napanuora ja sikiökalvot. Teoksessa Paananen, Ulla – Pietiläinen, Sirkka – Raussi-Lehto, Eija – Äimälä, Anna-Mari (toim.). Kättilötyö: Raska-

us, synnytys ja lapsivuodeaika. 6. uudistettu painos. Keuruu: Edita Publishing Oy. 134–135.

Locksmith, G. J. – Clark, P – Duff, P – Schultz, G. S. 1999. Amniotic fluid matrix metalloproteinase-9 levels in women with preterm labor and suspected intra-amniotic infection. *Obstetrics & Gynecology*. 94 (1). 1–6.

Locksmith, G. J. – Clark, P – Duff, P – Saade, Gregory R. – Schultz, G. S. 2001. Amniotic fluid concentrations of matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 during pregnancy and labor. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 184. 159–164.

Maymon, Eli – Romero, Roberto – Pacora, Percy – Gomez, Ricardo – Atheyde, Neil – Edwin, Sam – Yoon, Bo H. 2000. Human neutrophil collagenase (matrix metalloproteinase 8) in parturition, premature rupture of the membranes, and intrauterine infection. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 183. 94–99.

Maymon, E. – Romero, R. – Chaiworapongsa, T. – Berman, S. – Conoscenti G. – Gomez, R. – Edwin, S. 2001. Amniotic fluid matrix metalloproteinase-8 in preterm labor with intact membranes. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 185 (5). 1149–1155.

Mahlamäki, Eija K. 2004. Virtausytometrian periaate. Teoksessa Penttilä, Ilkka (toim.): *Kliiniset Laboratoriotutkimukset*. Porvoo: WS Bookwell Oy. 286.

Meri, Seppo – Julkunen Ilkka 2011. Luontaiset puolustusmekanismit. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti (toim.): *Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet*, kirja 2. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 34, 37, 46–49.

Mikkola, Kaija – Tommiska, Viena – Hovi, Petteri – Kajantie, Eero 2009. Keskosesta aikuiseksi. *Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim* 125(12). 1341–1347.

Mäenpää, Pia 2012. Ihmisperäisiä näytteitä ja näytetietoja koskeva lainsäädäntö (08/2012). BioMeditech Institute of Biosciences and Medical technology. 9-12. Verkko-dokumentti. Luettavissa osoitteessa: <[http://www.uta.fi/tutkimus/etiikka/ihmis/ihmispe-raiset\\_naytteet-1.pdf](http://www.uta.fi/tutkimus/etiikka/ihmis/ihmispe-raiset_naytteet-1.pdf)>. Luettu 19.3.2015.

Nien, JK – Yoon, BH – Espinoza, J – Kusanovic, JP – Erez, O – Soto, E – Richani, K – Gomez, R – Hassan, S – Mazor, M – Edwin, S – Bahado-Singh, R – Romero, R 2006. A rapid MMP-8 bedside test for the detection of intra-amniotic inflammation identifies patients at risk for imminent preterm delivery. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 95 (4). 1025–1030.

Nuutila, Mika 2007. Raskaudenajan ongelmia. Teoksessa Mäyränpää, Mikko: *Therapia Fennica*. Luettavissa sähköisesti osoitteessa <[http://therapiafennica.fi/wiki/index.php?title=Raskaudenajan\\_ongelmia](http://therapiafennica.fi/wiki/index.php?title=Raskaudenajan_ongelmia)>. Luettu 18.9.2014.

Paavonen, Jorma 2011. Gynekologiset infektiot. Teoksessa Ylikorkiala, Olavi – Tapanainen, Juha (toim.): *Naistentaudit ja synnytykset*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 286–299.

Pietiläinen, Sirkka – Väyrynen, Pirjo 2015. Raskauden ajan muutokset. Teoksessa Paananen, Ulla – Pietiläinen, Sirkka – Raussi-Lehto, Eija – Äimälä, Anna-Mari (toim.).

Kätilötyö – Raskaus, synnytys ja lapsivuodeaika. 6. uudistettu painos. Keuruu: Edita Publishing Oy. 161.

Pradhan-Palikhe, Pratikshya 2001. Matrix metalloproteinase-8 as a diagnostic tool for the inflammatory and malignant diseases. Väitöskirja. Faculty of Medicine. University of Oulu. 17–29.

Product Category: Luminex Assay Principle. R&D Systems, Inc. Verkkodokumentti. <[http://www.rndsystems.com/product\\_detail\\_objectname\\_luminex\\_assay\\_principle.aspx](http://www.rndsystems.com/product_detail_objectname_luminex_assay_principle.aspx)>. Luettu 18.12.2014.

R&D Systems™ 2014. Magnetic Luminex® Screenin Assay Human Premixed Multi-Analyte Kit. Menetelmäohje.

Rahkonen, Leena 2010. Preterm delivery and selected biomarkers : phosphorylated insulin-like growth factor-binding protein-1 and matrix metalloproteinase-8 – in cervical fluid. Väitöskirja. Department of Obstetrics and Gynecology. University of Helsinki. 13, 19-24.

RayBiotech, Inc 2009. RayBio® Biotin Label-based human Antibody Array 1. Menetelmäohje.

Reiman, M. – Kujari, H. – Ekholm, E. – Lapinleimu, H. – Lehtonen, L. – Haataja, L. 2008. Interleukin-6 polymorphism is associated with chorioamnionitis and neonatal infections in preterm infants. The Journal of Pediatrics. 153 (1). 19–24.

Romero, Roberto – Espinoza, Jimmy – Goncalves, Luis F. – Kusanovic, Juan Pedro – Friel, Lara A. – Nien, Jyh Kae 2006. Inflammation in preterm and term labour and delivery. Semin Fetal Neonatal Med. 11 (5). 317-326.

Ryyänen, Markku 2015. Sikiödiagnostiikka. Teoksessa Paananen, Ulla – Pietiläinen, Sirkka – Raussi-Lehto, Eija – Äimälä, Anna-Mari (toim.). Kätilötyö: Raskaus, synnytys ja lapsivuodeaika. 6. uudistettu painos. Keuruu: Edita Publishing Oy. 360–361.

Saarikoski, Seppo 2011. Synnytyksen käynnistyminen ja raskauden keston häiriöt. Teoksessa Ylikorkiala, Olavi – Tapanainen, Juha (toim.): Naistentaudit ja synnytykset. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 396-411.

Sariola, Anna – Tikkanen, Minna 2011. Normaali synnytys. Teoksessa Ylikorkiala, Olavi – Tapanainen, Juha (toim.): Naistentaudit ja synnytykset. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 308, 315, 317.

Savolainen, Kari – Parviainen, Markku 2010. Immunokemialliset menetelmät. Teoksessa Niemelä, Onni – Pulkki, Kari (toim.): Kliininen laboratoriolääketiede – Kliininen kemia ja hematologia. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy. 65–66.

Shim, Soon-Sup – Romero, Roberto – Jun, Jong Kwan – Moon, Kyung Chul – Kim, Gilja – Yoon, Bo Hyun 2005. C-reactive protein concentration in vaginal fluid as a marker for intra-amniotic inflammation/infection in preterm premature rupture of membranes. The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine. 18 (6). 417–422

Solunetti 2006. Solubiologia: Soluväliaine. Verkkodokumentti. Luettavissa sähköisesti osoitteessa <<http://www.solunetti.fi/fi/>>. Luettu 6.3.2015.



Street, Maria E. – Seghini, Pietro – Fieni, Stefania – Ziveri, Maria Angela – Volta, Cecilia – Martorana, Davide – Viani, Isabella – Gramellini, Dandolo – Bernasconi, Sergio 2006. Changes in interleukin-6 and IGF system and their relationships in placenta and cord blood in newborns with fetal growth restriction compared with controls. *European Journal of Endocrinology*. 155. 567–574.

Stefanovic, Vedran 2015. Uhkaava ennenaikainen synnytys. Teoksessa Paananen, Ulla – Pietiläinen, Sirkka – Raussi-Lehto, Eija – Äimälä, Anna-Mari (toim.). *Kätilötyö – Raskaus, synnytys ja lapsivuodeaika*. 6. uudistettu painos. Keuruu: Edita Publishing Oy. 459–469.

Tarim, E – Bağis, T – Kiliçdağ, EB – Sezgin, N – Yanik, F 2005. Are amniotic fluid C-reactive protein and glucose levels, and white blood cell counts at the time of genetic amniocentesis related with preterm delivery? *J Perinat Med*. 33 (6). 524–529.

Thermo Electron Oy 2005. Multiscan® EX mikrolevylukija. Lyhennelmä englannin kielestä käyttöohjeesta. Versio 3.0.

Tieteen termipankki 2014. Biologia: biomarkkeri. Verkkodokumentti. <<http://www.tieteentermipankki.fi/wiki/Biologia:biomarkkeri>>. Luettu 15.3.2015.

Tiitinen, Aila 2014. Korioamnioniitti (kohtutulehdus, sikiökalvojen tulehdus). *Lääkärikirja Duodecim*. Luettavissa sähköisesti osoitteessa <<http://www.terveyskirjasto.fi>>. Artikkelin tunnus: dlk01137 (016.046). Luettu 27.11.2014.

Tiitinen, Aila 2013. Tietoa potilaalle: Äitiysneuvolaseuranta. *Lääkärikirja Duodecim*. Luettavissa sähköisesti osoitteessa <<http://www.terveyskirjasto.fi>>. Artikkelin tunnus: dlk00186 (008.005). Luettu 18.9.2014.

Trochez-Martinez, R. D. – Smith, P – Lamont, R. F 2007. Use of C-reactive protein as a predictor of chorioamnionitis in preterm prelabour rupture of membranes: a systematic review. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 114 (7). 796–801.

Uotila, Jukka – Sikkinen, Jutta 2009. Uhkaava ennenaikainen synnytys - ehkäistä vai synnyttää? *Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim* 125 (12). 1325–1331

Vadillo-Ortega, Felipe – Hernandez, Antonia – Gonzalez-Avila, Georgina – Bermejo, Luisa – Iwata, Kazushi – Strauss III, Jerome F 1996. Increased matrix metalloproteinase activity and reduced tissue inhibitor of metalloproteinases-1 levels in amniotic fluids from pregnancies complicated by premature rupture of membranes. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 174. 1371–1376.

Xu, Ping – Alfaidy, Nadia – Challis, John R. G. 2002. Expression of Matrix Metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in human placenta and fetal membranes in relation to preterm and term labor. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 87 (3). 1353–1361.

Yhtyneet Medix laboratoriot 2013. Insuliinin kaltainen kasvutkijä 1. Verkkodokumentti. Saatavilla sähköisesti (käytettävissä tunnuksilla): <[www.terveysportti.fi](http://www.terveysportti.fi)> Artikkelin tunnus: lab83901 (I-400)

Yritysprofiili. Medix Biochemica. Verkkodokumentti. <[https://www.medixbiochemica.com/company/company\\_profile/fi\\_FI/Yritysprofiili\\_1/](https://www.medixbiochemica.com/company/company_profile/fi_FI/Yritysprofiili_1/)>. Luettu 18.9.2014.

Åkerman, Kari 2010. Immunokemialliset analysaattorit. Teoksessa Niemelä, Onni – Pulkki, Kari (toim.): Kliininen laboratoriolääketiede – Kliininen kemia ja hematologia. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy. 84.

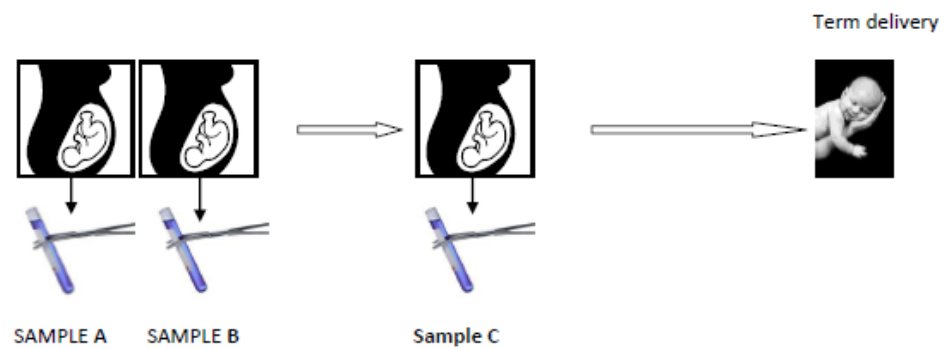
Ämmälä Pirkko – Aitokallio-Tallberg, Ansa 2011. Sikiöön siirtyvät infektiot. Teoksessa Ylikorkiala, Olavi – Tapanainen, Juha (toim.): Naistentaudit ja synnytykset. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 517–520.

Liite 1. Näyteryhmät RayBio® Biotin Label-based Human Antibody Array 1  
määrittämisessä (Medix Biochemica)

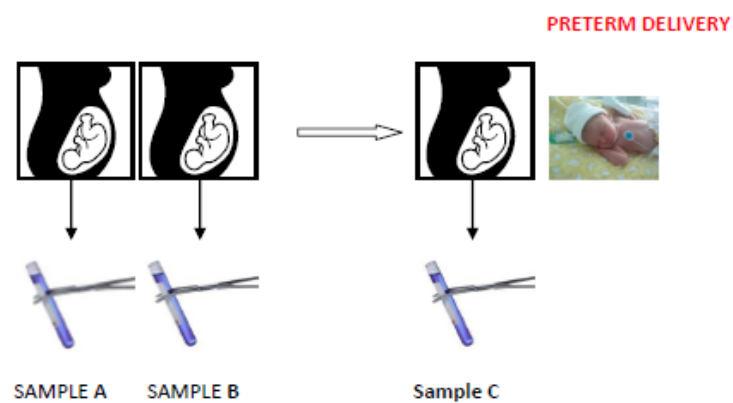
Group a) Uneventful term pregnancy



Group b) Symptomatic women with term delivery



Group c) Symptomatic women with term delivery=CASE



Liite 2. RayBio® Biotin Label-bases Human Antibody List (RayBiotech, Inc 2009.)

RayBio® Biotin Label-based Human Antibody List

1	Positive Ia	61	CCR	181	CD115	241	IL-11/IL-11V2
2	Positive Ib	62	CCR	182	CCR	242	IL-11/IL-11V2
3	Positive Ic	63	CCR	183	GFR-alpha-1	243	IL-11/IL-11V2
4	neg	64	CCR	184	GFR-alpha-2	244	IL-11/IL-11V2
5	6Cline	65	CCR	185	GFR-alpha-3	245	IL-11/IL-11V2
6	Actin A	66	CCR	186	GFR-alpha-4	246	IL-11/IL-11V2
7	Actin B	67	CCR	187	GFR-alpha-5	247	IL-11/IL-11V2
8	Actin C	68	CCR	188	GFR-alpha-6	248	IL-11/IL-11V2
9	Actin D	69	CCR	189	GFR-alpha-7	249	IL-11/IL-11V2
10	Actin E	70	CCR	190	GFR-alpha-8	250	IL-11/IL-11V2
11	Actin F	71	CCR	191	GFR-alpha-9	251	IL-11/IL-11V2
12	Actin G	72	CCR	192	GFR-alpha-10	252	IL-11/IL-11V2
13	Actin H	73	CCR	193	GFR-alpha-11	253	IL-11/IL-11V2
14	Actin I	74	CCR	194	GFR-alpha-12	254	IL-11/IL-11V2
15	Actin J	75	CCR	195	GFR-alpha-13	255	IL-11/IL-11V2
16	Actin K	76	CCR	196	GFR-alpha-14	256	IL-11/IL-11V2
17	Actin L	77	CCR	197	GFR-alpha-15	257	IL-11/IL-11V2
18	Actin M	78	CCR	198	GFR-alpha-16	258	IL-11/IL-11V2
19	Actin N	79	CCR	199	GFR-alpha-17	259	IL-11/IL-11V2
20	Actin O	80	CCR	200	GFR-alpha-18	260	IL-11/IL-11V2
21	Actin P	81	CCR	201	GFR-alpha-19	261	IL-11/IL-11V2
22	Actin Q	82	CCR	202	GFR-alpha-20	262	IL-11/IL-11V2
23	Actin R	83	CCR	203	GFR-alpha-21	263	IL-11/IL-11V2
24	Actin S	84	CCR	204	GFR-alpha-22	264	IL-11/IL-11V2
25	Actin T	85	CCR	205	GFR-alpha-23	265	IL-11/IL-11V2
26	Actin U	86	CCR	206	GFR-alpha-24	266	IL-11/IL-11V2
27	Actin V	87	CCR	207	GFR-alpha-25	267	IL-11/IL-11V2
28	Actin W	88	CCR	208	GFR-alpha-26	268	IL-11/IL-11V2
29	Actin X	89	CCR	209	GFR-alpha-27	269	IL-11/IL-11V2
30	Actin Y	90	CCR	210	GFR-alpha-28	270	IL-11/IL-11V2
31	Actin Z	91	CCR	211	GFR-alpha-29	271	IL-11/IL-11V2
32	Actin AA	92	CCR	212	GFR-alpha-30	272	IL-11/IL-11V2
33	Actin AB	93	CCR	213	GFR-alpha-31	273	IL-11/IL-11V2
34	Actin AC	94	CCR	214	GFR-alpha-32	274	IL-11/IL-11V2
35	Actin AD	95	CCR	215	GFR-alpha-33	275	IL-11/IL-11V2
36	Actin AE	96	CCR	216	GFR-alpha-34	276	IL-11/IL-11V2
37	Actin AF	97	CCR	217	GFR-alpha-35	277	IL-11/IL-11V2
38	Actin AG	98	CCR	218	GFR-alpha-36	278	IL-11/IL-11V2
39	Actin AH	99	CCR	219	GFR-alpha-37	279	IL-11/IL-11V2
40	Actin AI	100	CCR	220	GFR-alpha-38	280	IL-11/IL-11V2
41	Actin AJ	101	CCR	221	GFR-alpha-39	281	IL-11/IL-11V2
42	Actin AK	102	CCR	222	GFR-alpha-40	282	IL-11/IL-11V2
43	Actin AL	103	CCR	223	GFR-alpha-41	283	IL-11/IL-11V2
44	Actin AM	104	CCR	224	GFR-alpha-42	284	IL-11/IL-11V2
45	Actin AN	105	CCR	225	GFR-alpha-43	285	IL-11/IL-11V2
46	Actin AO	106	CCR	226	GFR-alpha-44	286	IL-11/IL-11V2
47	Actin AP	107	CCR	227	GFR-alpha-45	287	IL-11/IL-11V2
48	Actin AQ	108	CCR	228	GFR-alpha-46	288	IL-11/IL-11V2
49	Actin AR	109	CCR	229	GFR-alpha-47	289	IL-11/IL-11V2
50	Actin AS	110	CCR	230	GFR-alpha-48	290	IL-11/IL-11V2
51	Actin AT	111	CCR	231	GFR-alpha-49	291	IL-11/IL-11V2
52	Actin AU	112	CCR	232	GFR-alpha-50	292	IL-11/IL-11V2
53	Actin AV	113	CCR	233	GFR-alpha-51	293	IL-11/IL-11V2
54	Actin AW	114	CCR	234	GFR-alpha-52	294	IL-11/IL-11V2
55	Actin AX	115	CCR	235	GFR-alpha-53	295	IL-11/IL-11V2
56	Actin AY	116	CCR	236	GFR-alpha-54	296	IL-11/IL-11V2
57	Actin AZ	117	CCR	237	GFR-alpha-55	297	IL-11/IL-11V2
58	Actin BA	118	CCR	238	GFR-alpha-56	298	IL-11/IL-11V2
59	Actin BB	119	CCR	239	GFR-alpha-57	299	IL-11/IL-11V2
60	Actin BC	120	CCR	240	GFR-alpha-58	300	IL-11/IL-11V2

RayBio® Biotin Label-based Human Antibody List...continued

301	Internal Control Ia	361	MIF	421	PECAM-1/CD31	481	Blank
302	Internal Control Ib	362	MIF	422	PECAM-1/TSG-14	482	Blank
303	Internal Control Ic	363	MIF	423	PECAM-1/CD31	483	Blank
304	Internal Control Id	364	MIF	424	PECAM-1/CD31	484	Blank
305	Internal Control Ie	365	MIF	425	PECAM-1/CD31	485	Blank
306	Internal Control If	366	MIF	426	PECAM-1/CD31	486	Blank
307	Internal Control Ig	367	MIF	427	PECAM-1/CD31	487	Blank
308	Internal Control Ih	368	MIF	428	PECAM-1/CD31	488	Blank
309	Internal Control Ii	369	MIF	429	PECAM-1/CD31	489	Blank
310	Internal Control Ij	370	MIF	430	PECAM-1/CD31	490	Blank
311	Internal Control Ik	371	MIF	431	PECAM-1/CD31	491	Blank
312	Internal Control Il	372	MIF	432	PECAM-1/CD31	492	Blank
313	Internal Control Im	373	MIF	433	PECAM-1/CD31	493	Blank
314	Internal Control In	374	MIF	434	PECAM-1/CD31	494	Blank
315	Internal Control Io	375	MIF	435	PECAM-1/CD31	495	Blank
316	Internal Control Ip	376	MIF	436	PECAM-1/CD31	496	Blank
317	Internal Control Iq	377	MIF	437	PECAM-1/CD31	497	Blank
318	Internal Control Ir	378	MIF	438	PECAM-1/CD31	498	Blank
319	Internal Control Is	379	MIF	439	PECAM-1/CD31	499	Blank
320	Internal Control It	380	MIF	440	PECAM-1/CD31	500	Blank
321	Internal Control Iu	381	MIF	441	PECAM-1/CD31	501	Blank
322	Internal Control Iv	382	MIF	442	PECAM-1/CD31	502	Blank
323	Internal Control Iw	383	MIF	443	PECAM-1/CD31	503	Blank
324	Internal Control Ix	384	MIF	444	PECAM-1/CD31	504	Blank
325	Internal Control Iy	385	MIF	445	PECAM-1/CD31	505	Blank
326	Internal Control Iz	386	MIF	446	PECAM-1/CD31	506	Blank
327	Internal Control Ja	387	MIF	447	PECAM-1/CD31	507	Blank
328	Internal Control Jb	388	MIF	448	PECAM-1/CD31	508	Blank
329	Internal Control Jc	389	MIF	449	PECAM-1/CD31	509	Blank
330	Internal Control Jd	390	MIF	450	PECAM-1/CD31	510	Blank
331	Internal Control Je	391	MIF	451	PECAM-1/CD31	511	Blank
332	Internal Control Jf	392	MIF	452	PECAM-1/CD31	512	Blank
333	Internal Control Jg	393	MIF	453	PECAM-1/CD31	513	Blank
334	Internal Control Jh	394	MIF	454	PECAM-1/CD31	514	Blank
335	Internal Control Ji	395	MIF	455	PECAM-1/CD31	515	Blank
336	Internal Control Jj	396	MIF	456	PECAM-1/CD31	516	Blank
337	Internal Control Jk	397	MIF	457	PECAM-1/CD31	517	Blank
338	Internal Control Jl	398	MIF	458	PECAM-1/CD31	518	Blank
339	Internal Control Jm	399	MIF	459	PECAM-1/CD31	519	Blank
340	Internal Control Jn	400	MIF	460	PECAM-1/CD31	520	Blank
341	Internal Control Jo	401	MIF	461	PECAM-1/CD31	521	Blank
342	Internal Control Jp	402	MIF	462	PECAM-1/CD31	522	Blank
343	Internal Control Jq	403	MIF	463	PECAM-1/CD31	523	Blank
344	Internal Control Jr	404	MIF	464	PECAM-1/CD31	524	Blank
345	Internal Control Js	405	MIF	465	PECAM-1/CD31	525	Blank
346	Internal Control Jt	406	MIF	466	PECAM-1/CD31	526	Blank
347	Internal Control Ju	407	MIF	467	PECAM-1/CD31	527	Blank
348	Internal Control Jv	408	MIF	468	PECAM-1/CD31	528	Blank
349	Internal Control Jw	409	MIF	469	PECAM-1/CD31	529	Blank
350	Internal Control Jx	410	MIF	470	PECAM-1/CD31	530	Blank
351	Internal Control Jy	411	MIF	471	PECAM-1/CD31	531	Blank
352	Internal Control Jz	412	MIF	472	PECAM-1/CD31	532	Blank
353	Internal Control Ka	413	MIF	473	PECAM-1/CD31	533	Blank
354	Internal Control Kb	414	MIF	474	PECAM-1/CD31	534	Blank
355	Internal Control Kc	415	MIF	475	PECAM-1/CD31	535	Blank
356	Internal Control Kd	416	MIF	476	PECAM-1/CD31	536	Blank
357	Internal Control Ke	417	MIF	477	PECAM-1/CD31	537	Blank
358	Internal Control Kf	418	MIF	478	PECAM-1/CD31	538	Blank
359	Internal Control Kg	419	MIF	479	PECAM-1/CD31	539	Blank
360	Internal Control Kh	420	MIF	480	PECAM-1/CD31	540	Blank